

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА “БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И
НУТРИГЕНОМИКА”

Богдан Русев Хаджиев

ВРЪЗКА МЕЖДУ ВИТАМИН D И АНДРОГЕНЕН
СТАТУС ПРИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ПРОСТАТАТА

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен “Доктор”
по научна специалност „Биохимия“

Научен ръководител: проф. Бистра Галунска, дфарм.

Научен консултант: †проф. д-р Александър Хинев, дм.

Официални рецензенти:

Проф. Регина Комса-Пенкова, дбн, професор по Биохимия

Проф. Диана Георгиева Иванова, дбн, професор по Биохимия

Варна, 2018

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на заседание на катедрен съвет на Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна, състояло се на 20 април 2018 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд съдържа 155 страници, 26 фигури и 25 таблици. Цитирани са 333 литературни източника.

Номерацията на частите, фигурите и таблиците в автореферата съответства на тази от дисертацията. Пълните наименования на цитираните литературни източници са включени в дисертацията.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 08 юни 2018 г. от 10:30 часа в Аудитория №816 на Факултета по фармация, ет.8, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение.....	7
Цел и задачи.....	10
Материал и методи.....	13
I. Пациенти.....	13
II. Дизайн на изследването.....	14
III. Методи.....	16
Клинични методи.....	16
Хистологични методи.....	16
Лабораторни методи.....	17
Статистически методи.....	20
Резултати и обсъждане.....	22
I. Пациенти с доброкачествени заболявания на простатата.....	22
Обща характеристика на пациентите с доброкачествени заболявания на простатата.....	22
Витамин D статус на пациентите с доброкачествени заболявания на простатата.....	24
Андрогенен статус при пациенти с доброкачествени заболявания на простатата.....	29
Взаимовръзка между витамин D и андрогени.....	34
Обсъждане на резултатите.....	37
II. Пациенти с простатен карцином.....	45
Обща характеристика на пациентите с простатен карцином.....	45
Оценка на витамин D статуса на пациентите с простатен карцином.....	48
Оценка на андрогенния статус на пациентите с простатен карцином.....	61
Корелативни зависимости между отделните андрогени и клинични и биохимични параметри, отразяващи хода на заболяването.....	73
Обсъждане на резултатите.....	77

III. Изследване на прогностичната стойност и диагностичната ефективност на витамин D и андрогени при злокачествени заболявания на простатата.....	87
Оценяване влиянието на изследваните андрогени върху витамин D статуса чрез многофакторен регресионен анализ.....	87
Оценяване влиянието на витамин D статуса, андрогени и утвърдени рискови фактори за простатен карцином върху агресивността на тумора чрез многофакторен регресионен анализ.....	89
Оценка на диагностичната ефективност на изследваните стероиди (калцидиол и андрогени) чрез ROC анализ.....	92
Обсъждане на резултатите.....	94
Обобщение на основните резултати.....	96
Изводи.....	98
Приноси.....	100
Списък на публикациите и участията във връзка с дисертационния труд.....	102
Финансиране.....	103
Благодарности.....	104

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА НА АВТОРЕФЕРАТА

Съкращения на български език

ДЗП – доброкачествени заболявания на простатата

ДПХ – доброкачествена простатна хиперплазия

СЗО – Световна здравна организация

Съкращения на английски език

25OHD – калцидиол

AR – андрогенен рецептор

BCR – риск от биохмичен рецидив

BMI – индекс на телесна маса

DHEAs – дехидроепиандростерон сулфат

EPE – екстрапростатно разпространение на тумора

EUA – Европейска урологична асоциация

GS – скор на Gleason

LAD – локално авансирал простатен карцином

LNI – засягане на лимфни възли

PCa – простатен карцином

PIN – простатна интраепителна неоплазия

PSA – простатно специфичен антиген

SHBG – плазмен глобулин, свързващ половите хормони

SVI – засягане на семенни мехурчета

VDBP – транспортен белтък за витамин D и метаболитите му

VDR – витамин D рецептор

ВЪВЕДЕНИЕ

Заболяванията на простатата, бенигнени или малигнени, са едни от най-често срещаните сред мъжката популация. Оценено е, че всеки трети от мъжете над 50 годишна възраст страда от доброкачествено заболяване на простатата, а сред злокачествените заболявания простатният карцином е едно от най-често срещаните в напреднала възраст. В България това заболяване е на второ място по честота. По данни на Националния раков регистър до 2015 година броят на новозаболените мъже се увеличава с няколкостотин годишно и достига до 72,9 болни с простатен карцином на 100 000 мъже (Валерианова и съавт., 2017). По данни на СЗО средната честота на рака на простатата в Европа е около 60 на 100 000 мъже (Ferlay et al, 2013). По тази причина простатният карцином е сериозен проблем за страните със застаряващо население, към които спада и България. Превенцията на простатния карцином е предизвикателство както за изследователите, изучаващи фундаменталната канцерогенеза, така и за клиницистите, занимаващи се с диагностиката и лечението на едно от най-разпространените неопластични заболявания.

През последните години се натрупаха редица данни за ролята на т.н. модифициращи фактори върху риска и прогресията на тези често срещани доброкачествени и злокачествени заболявания на простатната жлеза. Към тези модифициращи фактори се отнасят диетата и начина на живот, които до голяма степен определят витамин D статуса на организма.

Една от множеството функции на витамин D е свързана с антипролиферативни и проапоптозни действия върху простатните клетки. Това го превръща в потенциален антипролиферативен и антитуморен метаболит срещу различни заболявания на простатата, включително и простатен карцином. Потенциалното противотуморно действие на витамин D при простатен карцином се опосредства от неговите метаболити, от ензимите, участващи в синтеза на тези метаболити, от витамин D рецептора, както и от гените, чиято експресия се регулира от активната форма на витамин D. Един от дискусиябилните въпроси в днешно време е дали дефицит на витамин D може да доведе до увеличен риск от поява и развитие на простатен карцином. През последните години са проведени редица проучвания за изясняване на

връзката на витамин D с риска и прогресията на простатния карцином, но този въпрос все още остава спорен и неизяснен. В България има единични пилотни проучвания върху D статуса при заболявания на простатата. По-комплексни и многостранни изследвания не само върху витамин D статуса, но и върху взаимовръзките му с андрогенния статус и с клинични детерминанти за доброкачествено или злокачествено заболяване на простатата не са провеждани.

Друг фактор, играещ важна роля върху риска и прогресията на простатния карцином е андрогенният статус. Разбирането на андрогенния метаболизъм е от съществено значение при търсенето на нови терапевтични таргети при простатен карцином. С прогресиране на заболяването настъпват промени в метаболизма на андрогените, поради променена експресия на стероидогенните ензими, мутации в отделните компоненти от метаболизма и транспорта на андрогените. Тези промени могат да бъдат причина както за прогресия и повишена агресивност на туморния процес, така и за резистентност към хормоналната терапия.

Андрогените като стероидни хормони регулират редица биологични функции в простатната жлеза, включително пролиферация и растеж на простатните епителни клетки. Редица проучвания сочат, че дисбаланс в андрогенния метаболизъм играе важна роля за отключване и развитие на простатен карцином. Счита се, че балансът между андроген-индуцираната клетъчна пролиферация и апоптоза е ключов фактор за поддържане на нормален растеж на простатната жлеза. Промяна в този баланс (повишен биосинтез, намалена инактивация на андрогени) може да бъде причина за повишена клетъчна пролиферация, растеж и развитие на неопластични заболявания на простатната жлеза.

Връзката между андрогени, риска и прогресията на простатния карцином все още не е напълно изяснена. Според „андрогенната хипотеза“ увеличени нива на тестостерон са предпоставка за рак на простатата. В последните години тези схващания се преосмислят в полза на т. н. хипотеза на „насищане на андрогенния рецептор“, според която ниски нива на тестостерон са свързани с увеличен риск от простатен карцином. До момента проучванията в тази насока са твърде оскъдни. Това обоснова една от задачите на настоящото проучване – изследване на андрогенния

статус при мъже от българската популация с бенигнени и малигнени заболявания на простатата.

Общата метаболитна връзка и сходството в регулаторните механизми на витамин D и андрогени поставят въпроса за взаимовръзката между витамин D и андрогеногенеза при простатен карцином. Редица данни от литературата дават основание да се предполага, че от една страна серумните нива на витамин D са важен фактор в андроген-медираната сигнализация, а от друга андрогените активират биосинтеза на калцитриол и неговите антипролиферативни ефекти. В този смисъл, витамин D и андрогените играят важна роля както за поддържане на нормален метаболизъм в простатната жлеза, така и за предотвратяване на де-диференциацията на простатни ракови клетки в по-агресивен фенотип. Може да се очаква, че поддържането на адекватни нива на витамин D и андрогени би потиснало прогресията на простатния карцином, особено при пациенти в ранен стадий на заболяването, а корекция на витамин D статуса в оптимални граници би могла да бъде допълнителен терапевтичен подход при заболявания, свързани с дефицит на тестостерон, включително и при простатен карцином.

Подобни проучвания, изследващи потенциални взаимовръзки между нивата на витамин D и отделните стероиди, дефиниращи андрогенният статус при заболявания на простатата са изключително оскъдни в света, а в България не са правени. В този аспект резултатите от настоящото изследване биха допринесли за осмисляне на ролята на стероидите като потенциални предиктивни и/или прогностични фактори, особено при пациенти в ранен стадий на заболяването.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се направи сравнителен анализ на витамин D и андрогенен статус при пациенти с простатен карцином и пациенти с доброкачествени заболявания на простатата и да се проучат взаимовръзките между андрогени, витамин D и утвърдени клинични и биохимични параметри, характеризиращи тези заболявания.

ЗАДАЧИ

За изпълнението на целта бяха поставени следните **задачи**:

I. При пациенти с доброкачествени заболявания на простатата

1. Да се определи витамин D статуса чрез изследване на серумни нива на:
 - a. циркулиращ калцидиол;
 - b. биоактивен калцидиол;
 - c. витамин D свързващ глобулин (VDBP).
2. Да се оцени витамин D статуса според утвърдени критерии на Европейското дружество по ендокринология и на Института по медицина, САЩ.
3. Да се оцени влиянието на индекса на телесна маса и сезона върху витамин D статуса.
4. Да се изследват потенциални взаимовръзки между витамин D статус и простат-специфичен антиген (PSA).
5. Да се определи андрогенния статус чрез изследване на серумни нива на андрогени и техни прекурсори:
 - a. общ и свободен тестостерон;
 - b. андростендион;
 - c. дехидроепиандростерон сулфат (DHEAs);
 - d. серумен алфа-глобулин, свързващ полови хормони (SHBG).

6. Да се оцени влиянието на индекса на телесна маса и наличието на сезонни вариации в андрогенния статус.
7. Да се изследват причинно следствени връзки между витамин D, андрогенен статус и PSA.

II. При пациенти с карцином на простатната жлеза

1. Да се определи витамин D статуса чрез изследване на серумни нива на:
 - a. циркулиращ калцидиол;
 - b. биоактивен калцидиол;
 - c. витамин D свързващ глобулин (VDBP).
2. Да се оцени витамин D статуса според утвърдени критерии на Европейското дружество по ендокринология и на Института по медицина, САЩ.
3. Да се оцени влиянието на индекса на телесна маса и сезонните вариации във витамин D статуса.
4. Да се сравни витамин D статуса на пациенти с простатен карцином с този на пациенти с доброкачествени заболявания на простатата.
5. Да се изследват причинно-следствени връзки между витамин D статус и утвърдени клинично-лабораторни параметри за хода на заболяването (PSA, риск от биохимичен рецидив и скор на Gleason).
6. Да се определи андрогенния статус чрез изследване на серумни нива на андрогени и техни прекурсори:
 - a. общ и свободен тестостерон;
 - b. андростендион;
 - c. дехидроепиандростерон сулфат (DHEAs);
 - d. алфа-глобулин, свързващ полови хормони (SHBG).
7. Да се сравни андрогенния статус на пациенти с простатен карцином с този на пациенти с доброкачествени заболявания на простатата.
8. Да се оцени влиянието на индекса на телесна маса и наличието на сезонни вариации в андрогенния статус.
9. Да се изследват причинно-следствени връзки между витамин D, андрогенен статус и утвърдени клинично-лабораторни параметри

за хода на заболяването (PSA, риск от биохимичен рецидив и скор на Gleason).

III. Изследване на прогностичната стойност и диагностичната ефективност на витамин D и андрогени при злокачествени заболявания на простатата

1. Да се оцени влиянието на изследваните андрогени върху витамин D статуса чрез многофакторен регресионен анализ.
2. Да се оцени влиянието на витамин D статуса, андрогени и утвърдени рискови фактори за простатен карцином върху агресивността на тумора чрез многофакторен регресионен анализ.
3. Да се оцени диагностичната ефективност на изследваните стероиди (калцидиол и андрогени) чрез ROC анализ.

Извършените изследвания и дейности във връзка с представения дисертационен труд са стартирали след получаване на писмено одобрение от Комисията по етика на научните изследвания при МУ – Варна (Протокол № 54/19.05.2016 г.). Всеки пациент, заявил желание за участие в проучването, е подписал писмено информирано съгласие.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

I. Пациенти

Настоящото проспективно проучване включва общо 142 мъже с бенигнени и малигнени заболявания на простатната жлеза на възраст от 52 до 85 години. Пациентите са с хистологично доказани доброкачествени заболявания на простатата (ДЗП), суспектни за простатен карцином и такива с хистологично доказан простатен карцином, пролежали в Клиниката по Урология на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна през периода януари-декември 2015 година.

Болните са подбрани от специалисти уролози според критериите за включване и изключване в проучването.

Включващи критерии

- Мъже на възраст над 50 години
- Клинични данни за ДЗП, подлежаща на оперативно лечение /IPSS > 12; Qmax < 10 ml/sec; Vres > 100 ml¹; неуспех от консервативното лечение с алфа-блокери и 5-алфа редуктазни инхибитори/;
- Клинична суспекция за простатен карцином /патологично завишени стойности на простатноспецифичния антиген (PSA > 4 ng/ml); абнормна физикална находка при дигитално изследване на простатата и/или наличие на хипоехогенна зона при трансректална ехография на простатата/;
- Клинични и патоморфологични данни за простатен карцином, с показания за радикално оперативно лечение /възраст под 78г.; клиничен стадий <= T3; липса на клинични и образни данни за далечни метастази/;

¹ IPSS (international prostate symptom score) – международен простатен симптоматичен индекс ; Qmax при урофлоуметрия – максимална сила на уринната струя; Vres. – остатъчно количество урина

- Клинични и патоморфологични данни за простатен карцином, с показания за палиативно оперативно лечение /TURP/ - клинични данни за наличие на инфравезикална обструкция;
- Пациенти без проведено лечение или терапия на заболяването.

Исключващи критерии

- Пациенти под 50 годишна възраст;
- Пациенти със заболявания на простатата и лекувани с хормонална терапия;
- Пациенти с витамин D суплементиране;
- Наличие на остър възпалителен процес на простатната жлеза;
- Наличие на системна инфекция (сепсис);
- Пациенти с декомпенсирана сърдечна и/или дихателна недостатъчност; наличие на придружаващи заболявания, явяващи се контраиндикация за извършването на оперативно лечение, в т. ч. и употребата на индиректни антикоагуланти и антиагреганти.

II. Дизайн на изследването

Обект на изследването са пациенти с доброкачествени и злокачествени заболявания на простатната жлеза. За целите на настоящото проучване пациентите са разделени в две основни групи: пациенти с **бенигнни заболявания** на простатата и с **простатен карцином**.

1. Пациентите с **бенигнни заболявания** на простатата са стратифицирани според следните критерии:
 - серумни нива на PSA (гранична стойност 4 ng/ml);
 - серумни нива на калцидиол (гранична стойност 50 nmol/L);
 - BMI (гранична стойност BMI ≥ 25 kg/m²).
2. Пациентите с **простатен карцином** са разделени в подгрупи според следните критерии:
 - серумни нива на PSA (гранична стойност 20 ng/ml);
 - серумни нива на калцидиол (гранична стойност 50 nmol/L);
 - серумни нива на общ тестостерон (гранична стойност 12,1 nmol/L);
 - BMI (гранична стойност BMI ≥ 25 kg/m²);

- агресивност на туморния процес, оценявана по скората на Gleason (GS):
 - $GS < 7$ и $GS = 7 (3+4)$ – слаба агресивност;
 - $GS = 7 (4+3)$ или $GS > 7$ – силна агресивност.
- риск от биохимичен рецидив, оценен според препоръките на Европейското дружество по Урология от 2016 година
 - нисък;
 - умерен;
 - висок.
- степен на инвазия и метастазиране, оценени според препоръките на Европейското дружество по урология от 2016г.
 - засягане на семенни мехурчета (SVI);
 - засягане на лимфни възли (LNI);
 - разпространение на тумора извън простатната жлеза (EPE);
 - локализиран/авансирал простатен карцином (LAD).

3. Сравнителен анализ и корелативни зависимости

- сравнени са витамин D и андрогенния статус на двете основни групи пациенти
- сравнени са витамин D и андрогенния статус между подгрупите пациенти с доброкачествени заболявания на простатата и простатен карцином
- изследвани са корелативни зависимости между витамин D статус и андрогени и всеки един от утвърдените клинични и лабораторни показатели при пациентите с карцином на простатната жлеза.

Проучването не включва контролна група мъже на същата възраст без заболявания на простатата. Всички показатели, анализирани при пациентите с простатен карцином са съпоставяни с тези при болните с доброкачествени заболявания и са търсени съответните статистически значими различия.

III. Методи

Клинични методи

От медицинската документация бе ползвана информация за:

- анамнеза
- клинична диагноза
- клиничен стадий на заболяването (в случаите на простатен карцином)
- данни от антропометрични изследвания - ръст (m) и телесно тегло (kg) на селектираните болни за определяне на индекс на телесна маса (BMI) по формулата: $BMI = \text{тегло}/(\text{ръст})^2$.
- резултати от патоморфологичните изследвания на биопсичните и оперативни материали
- резултати от оценката по Gleason
- данни от имунохимични изследвания на серумните нива на туморния маркер PSA.

Хистологични методи

Хистоморфологичното изследване на биопсичен и оперативен материал от простатна жлеза е извършвано посредством стандартна хистологична техника (включване в парафин и оцветяване с хематоксилин/еозин).

Диагноза простатен карцином е поставена на 88 пациента, а 54 са диагностицирани с ДЗП.

При болните с простатен карцином риска от рецидив е оценен според препоръките на Европейското дружество по урология (Mottet et al, 2017).

Определяне стадия и локализацията на тумора

При определяне на стадия и локализацията на туморния процес е използвана TNM-градиращата система.

Определяне степента на инвазивност и метастазиране

Определянето на потенциала и степента на инвазия и метастазиране, както и прогнозата на простатния карцином са оценявани по следните показатели:

- SVI (seminal vesicles involvement) – засягане на семенни мехурчета;
- LNI (lymph nodes involvement) – засягане на лимфни възли;

- EPE (extra prostatic extension) – разпространение на тумора извън простатната жлеза;
- LAD (локално авансирал простатен карцином).

Определяне степента на хистологично диференциране на тумора (степен на туморна агресивност)

Степента на хистологично диференциране количествено е определена със скор на Gleason, който оценява агресивността на туморния процес и може да варира от 2 до 10:

- Скор на Gleason <7 , високо диференциран карцином, слаба агресивност, най-добра прогноза.
- Скор на Gleason ≥ 7 , умерено до ниско диференциран карцином, умерена до силна туморна агресивност

Определяне на риска от биохимичен рецидив

Рискът от рецидив бе определен според препоръките на Европейското дружество по Урология от 2016 година, като са взети под внимание нивата на PSA, клиничния стадий според TNM-класификацията и скор на Gleason.

Лабораторни методи

Преданалитичен етап

Събиране и съхранение на пробите

За изследване на заложените биохимични показатели, оценяващи витамин D и андрогенния статус към момента на поставяне на диагнозата е вземана 7 ml венозна кръв във вакутейнери тип Z (Greiner Bio One International GmbH). За отделяне на серума кръвта е центрофугирана при 3000 об./мин. за 10 минути. Отделеният кръвен серум е сепариран и аликутите са съхранявани при -86°C до извършване на анализа.

Взетите проби са равномерно разпределени в различните месеци и сезони през годината.

За гарантиране на добра аналитична надеждност на лабораторните резултати са използвани сертифицирани калибратори и контролни материали.

Аналитичен етап

1. Определяне на серумни нива на калцидиол чрез високоефективна течна хроматография с маселективна детекция

За анализа на калцидиол в кръвен серум е използван валидиран според изискванията на FDA метод, основан на хроматографско разделяне с маселективна детекция (Galunska et al, 2014).

2. Метод за определяне на бионаличен калцидиол

Бионаличният калцидиол се дефинира като сумата от свободния калцидиол и свързания със серумния албумин. Той отразява максималното количество калцидиол, което може да навлезе в клетките и да взаимодейства с VDR рецептора.

Изчислен е по следната формула (Bikle et al, 1986, Kim et al, 2017):

бионаличен калцидиол = свободен калцидиол + калцидиол, свързан с албумин

свободен калцидиол [nmol/L] = $\frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$, където

$a = K_{VDBP} \times K_{\text{албумин}} \times [\text{албумин}] + K_{VDBP}$

K_{VDBP} - афинитетна константа на калцидиол – VDBP; $K_{VDBP} = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$

$K_{\text{албумин}}$ - афинитетна константа на калцидиол – албумин; $K_{\text{албумин}} = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

$[\text{албумин}] = \text{концентрация на албумин (g/L)} / 66430 \text{ g/mol}$

$b = K_{VDBP} \times [VDBP] - K_{VDBP} \times [\text{калцидиол}] + K_{\text{албумин}} \times [\text{албумин}] + 1$

$[VDBP] = \text{концентрация на VDBP (g/L)} / 58000 \text{ g/mol}$

$c = - \text{концентрация на калцидиол в mol/L}$

калцидиол, свързан с албумин [nmol/L] = свободен калцидиол $\times (1 + K_{\text{албумин}} \times [\text{албумин}])$

3. Методи за определяне на витамин D свързващ глобулин (VDBP) и глобулин, свързващ половите хормони (SHBG)

Анализите са извършени с търговски китове на фирма „Immundiagnostik AG“, Германия. Методите за анализа на тези два показателя се основават

на неконкурентна „сандвич“ ELISA. Осъществява се количествено определяне, базирано на антиген-антитяло реакция. При определяне на VDBP се използват поликлонални заешки антитела, а за SHBG миши моноклонални антитела. Резултатите за VDBP са представени в mg/L, а за SHBG в nmol/L. Методите отговарят на критериите за чувствителност, специфичност и линейност за нуждите на изследването. Използвани са калибратори и контролни материали на фирмата производител за постигане на аналитична надеждност на лабораторните резултати.

4. *Метод за определяне на общ тестостерон, свободен тестостерон, андростендион и дехидроепиандростерон сулфат (DHEAs).*

Изследванията са извършени с търговски китове на фирма „IVD Demeditec Diagnostics, GmbH“, Германия. За количественото определяне на посочените андрогени са използвани конкурентни имуноензимни колориметрични методи, базирани на реакцията антиген-антитяло. При определяне на общия тестостерон се използват миши моноклонални антитела срещу свободен и белтъчно свързан тестостерон, а при определяне на свободния тестостерон, специфично антитяло. При определяне на андростендион се използва заешко поликлонално антитяло, а за DHEAs специфично антитяло. Резултатите за общия тестостерон са представени в nmol/L, за свободния тестостерон в pmol/L, за андростендион в nmol/L, за DHEAs в μ mol/L. Използвани са калибратори и контролни материали на фирма Bio-Rad Laboratories, Inc., USA за постигане на нужната аналитична надеждност на лабораторните резултати.

5. *Имунохимичен метод за определяне на PSA*

Данните за туморния маркер PSA са взети от медицинската документация на пациентите, включени в проучването. Серумните нива на PSA са определяни на автоматичен имунохимичен анализатор IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare Global) на принципа на директната хемилуминисценция (CLIA). Линейният диапазон на теста е от 0.04 до 150 ng/ml. Резултатите са представени в ng/ml.

Определени са следните производни на андрогените, носещи допълнителна информация за андрогенния статус.

6. *Свободен андрогенен индекс*

Свободният андрогенен индекс дава информация за нивото на бионаличния тестостерон (Khera et al, 2014, Weiss et al, 2008). Изчислява се като съотношение между общия серумен тестостерон и SHBG:

$$\text{свободен андрогенен индекс (\%)} = (\text{общ тестостерон/SHBG}) \times 100$$

Резултатите са представени в проценти.

7. *Процент свободен тестостерон*

Отразява съотношението на свободния спрямо общия тестостерон (Albisinni et al, 2012). Изчислява се по формулата:

$$\text{свободен тестостерон (\%)} = (\text{свободен/общ тестостерон}) \times 100$$

Резултатите са представени в проценти.

8. *PSA/общ тестостерон*

Дава информация за риска от простатен карцином в случаите на умерено повишен PSA (<10ng/ml) или PSA в референтни граници (<4ng/ml) и дефицит на тестостерон (Khera et al, 2014, Roden et al, 2008).

9. *Определяне на серумен албумин*

Определението е извършено на автоматичен биохимичен анализатор Olympus AU 400 в клинична лаборатория „Лаборекспрес“, Варна.

Статистически методи

Статистическият анализ на данните е извършен със статистическите пакети GraphPad Prism, version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA и IBM SPSS version 23. Бяха използвани следните методи:

- Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване;
- Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и разсейване на данните;
- One way ANOVA –за проверка на хипотези за различие между повече от две независими извадки;
- Непараметричен корелационен анализ на Spearman – за търсене на причинно-следствена зависимост между два количествени признака;

- Многофакторен регресионен анализ – за търсене на прогностична зависимост между повече от два количествени признака;
- ROC анализ – за оценка на диагностичната ефективност на отделните биохимични показатели;
- Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.

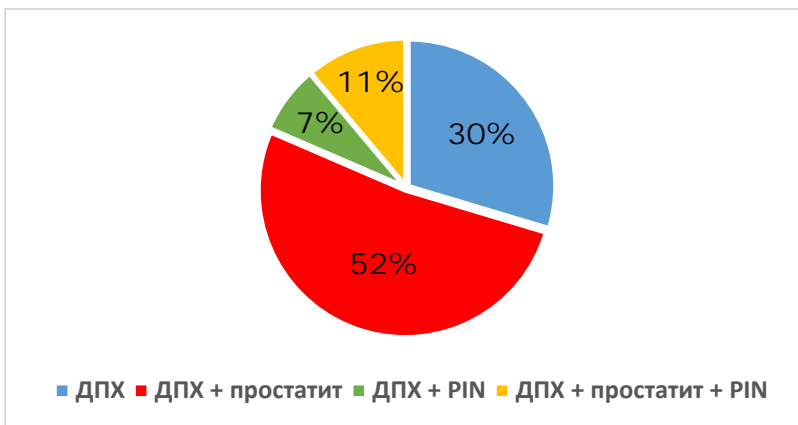
За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

I. Пациенти с доброкачествени заболявания на простатата

Обща характеристика на пациентите с доброкачествени заболявания на простатата

Изследвани са 54 мъже на възраст от 52 до 85 години (средна възраст 67.91 ± 7.21 години) с доброкачествени заболявания на простатата (ДЗП). Тази група включва пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ) и простатит (28 души), само с ДПХ (16 души), ДПХ, простатна епителна неоплазия (PIN) и простатит (6 души) и ДПХ и PIN (4 души). Процентното разпределение на пациентите според вида на ДЗП е представено на фигура 9.



Фиг.9. Процентно разпределение на ДЗП болните според вида на заболяването
ДПХ - доброкачествена простатна хиперплазия; PIN- простатна интраепителна неоплазия.

Средната стойност на индекса телесна маса (BMI) за болните с ДЗП е $26.38 \pm 3.178 \text{ kg/m}^2$. В групата с ДЗП 68% от случаите са с наднормено тегло или обезитет ($\text{BMI} \geq 25$), а 32% са с нормално тегло ($\text{BMI} < 25$).

Средната стойност на туморния маркер PSA е $5.38 \pm 4.39 \text{ ng/ml}$, което е с 34,5% над горно граничната стойност от 4.0 ng/ml. Средните стойности

на PSA, след стратифициране на пациентите според вида на ДЗП са представени на таблица 1.

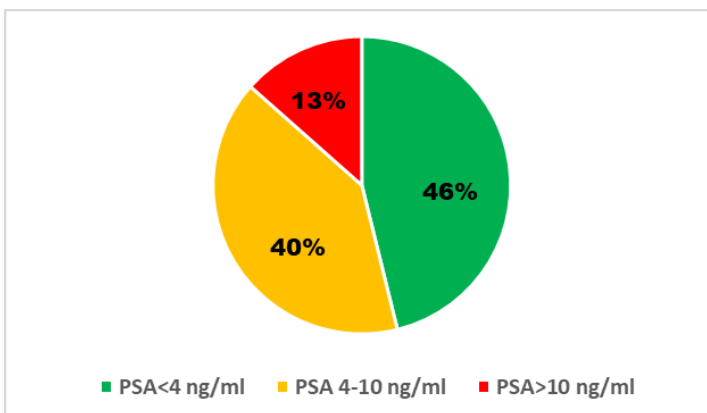
Таблица 1. Средни стойности на PSA според вида на доброкачественото заболяване на простатата

Показател	Вид доброкачествено заболяване на простатата			
	ДПХ Хсредно \pm SD	ДПХ и простатит Хсредно \pm SD	ДПХ и PIN Хсредно \pm SD	ДПХ, простатит и PIN Хсредно \pm SD
PSA, x\pmSD (ng/ml)	4.38 \pm 4.06	5.49 \pm 3.73	10.70 \pm 6.51	4.34 \pm 4.95

ДПХ-доброкачествена хиперплазия; PIN-простатна интраепителна неоплазия; референтна граница за PSA - 4.0 ng/ml.

От таблицата е видно, че при всички ДЗП подгрупи PSA е над горната референтна граница. Повишението на PSA е най-силно при болните с ДПХ и PIN (167%), следвано от пациентите с ДПХ и простатит (27%) и има приблизително еднакви стойности при групите само с ДПХ (9%) и ДПХ, простатит и PIN (8%).

В клиничната практика са утвърдени три интервала за PSA: референтни граници (до 4ng/ml), „сива зона“ със съмнение за бенигнени или малигнени заболявания на простатата (4 – 10ng/ml) и интервал със стойности на PSA над 10ng/ml, характерни за простатен карцином. Разпределението на ДЗП пациентите според тези три интервала на PSA е представено на фигура 10.



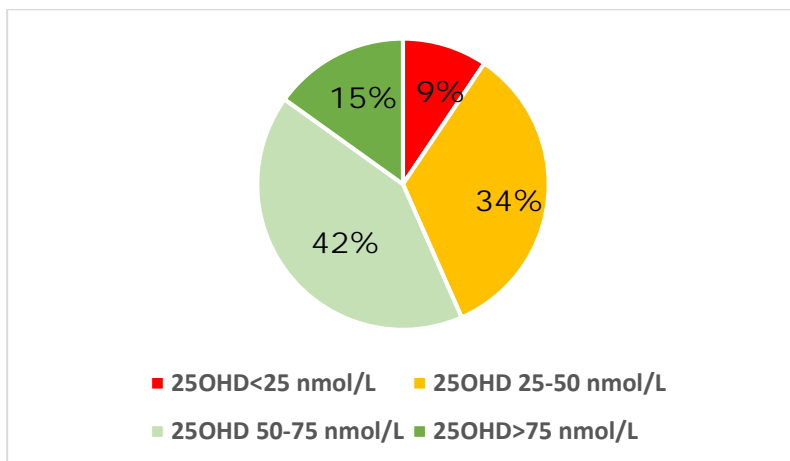
Фиг. 10. Процентно разпределение на пациентите според трите интервала за PSA
PSA < 4ng/ml - референтни интервал; PSA 4 -10ng/ml - „сива зона“ със съмнение за
бенигнени или малигнени заболявания на простатата; PSA > 10ng/ml - характерни за
простатен карцином.

Най-голям брой пациенти попадат в референтния интервал на PSA (24 души), следвани болните в „сивата зона“ (21 пациента), а най-малко са тези с нива на PSA над 10 ng/ml (7 души).

Според нивата на туморния маркер PSA групата болни с ДЗП е относително хомогенна, тъй като 86% от болните са със стойности в референтната област и в „сивата зона“, отхвърлящи съмнение за злокачествено заболяване.

Витамин D статус на пациентите с доброкачествени заболявания на простатата

Според Европейското ендокринологично дружество (Holick et al, 2011) маркер за витамин D статуса на индивида е серумната/плазмената концентрация на калцидиол. В зависимост от нивата на калцидиола, се определят следните референтни интервали, дефиниращи витамин D статуса: тежък дефицит при нива на серумен калцидиол под 25 nmol/L, лек дефицит с нива на калцидиол от 25 nmol/L до 50 nmol/L, витамин D недостатъчност от 50nmol/L до 75 nmol/L и оптимален витамин D статус с нива на калцидиол над 75 nmol/L. Разпределението на ДЗП пациентите според така дефинирания витамин D статус е представено на фигура 11.



Фиг. 11. Разпределение на ДЗП пациентите според витамин D статуса

серумен калцидиол (25OHD) < 25 nmol/L - тежък дефицит; серумен калцидиол (25OHD) 25 nmol/L - 50 nmol/L – лек дефицит; серумен калцидиол (25OHD) 50nmol/L - 75 nmol/L – витамин D недостатъчност; серумен калцидиол (25OHD) > 75 nmol/L – оптимален витамин D статус (Holick et al, 2011).

От фигурата е видно, че над 50% от пациентите са с оптимален и субоптимален витамин D статус (30 души), от които 22 са с витамин D недостатъчност и 8 с оптимален витамин D статус. С лек витамин D дефицит са 18 души. С. Най-малък е броят на пациентите с тежък витамин D дефицит (5 души).

Средните стойности на калцидиол – приет като индикатор на витамин D статуса, бионаличен калцидиол и VDBP – транспортен белтък на калцидиол в кръвта за ДЗП болните са представени на таблица 2.

Таблица 2. Средни нива на общ, бионаличен калцидиол и VDBP при болните с доброкачествени заболявания на простатата

Показател	ДЗП пациенти $\bar{x} \pm SD$ (n)	Референтни граници
калцидиол (nmol/L)	56.63 ± 21.71 (52)	<ul style="list-style-type: none"> •оптимални нива: ≥ 75 •витамин D недостатъчност: 50 - 74.9 •витамин D дефицит: < 50
бионаличен калцидиол (nmol/L)	6.00 ± 2.65 (39)	4.8 - 22.05 nmol/L ²
VDBP (mg/L)	304.00 ± 82.86 (40)	200 - 550 ³

ДЗП – доброкачествени заболявания на простатата; VDBP - белтък преносител на витамин D; n – брой пациенти.

Средните стойности на калцидиол за ДЗП групата са индикатор за витамин D недостатъчност. Другите два изследвани показателя, свързани с витамин D статуса, бионаличен калцидиол и VDBP са в посочените референтни граници. В последните години бионаличният калцидиол се въведе като допълнителен индикатор за по-точна оценка на витамин D статуса. Все още за този показател няма утвърдени референтни интервали. Като референтни стойности за бионаличния калцидиол сме използвали предложените от Pan Laboratories, САЩ.

Взаимовръзка между витамин D статус и биохимични маркери за простатна хиперплазия

Витамин D статус и PSA

PSA е утвърден биохимичен туморен маркер за оценка на пролиферативни и деструктивни процеси в простатната жлеза. Ето защо,

²Референтни граници според „Pathology associates medical laboratories“

(https://www.paml.com/sites/default/files/lab-test-connect/Bioavailable-Vitamin%20D%2025%20hydroxy_PAML.pdf)

³ Референтни граници, посочени търговския кит, използван за анализа на VDBP

изследвахме промените във витамин D статуса в зависимост от нивата на PSA при пациентите с ДЗП, имащи в своята генеза усилена пролиферация на простатата.

На таблица 3 са представени резултатите на ДЗП болните, стратифицирани в две групи съобразно нивата на PSA. Едната група включва пациенти с PSA в референтни граници (до 4 ng/ml), а другата нива на PSA над референтната област (> 4ng/ml).

Таблица 3. Средни стойности на калцидиол, бионаличен калцидиол и VDBP при ДЗП болни, стратифицирани според нивата на PSA

Показатели	ДЗП пациенти с PSA<4.0 ng/ml Хсредно ± SD (n)	ДЗП пациенти с PSA>4.0 ng/ml Хсредно ± SD (n)	p
калцидиол (nmol/L)	56.89 ± 19.02 (24)	55.84±24.39 (27)	ns
бионаличен калцидиол (nmol/L)	5.83 ± 2.57 (17)	6.450 ± 2.58 (20)	ns
VDBP (mg/ml)	310.1 ± 92.18 (17)	296.0 ± 78.34 (21)	ns

VDBP- белтък преносител на витамин D; PSA-простатно-специфичен антиген; n – брой пациенти; ns – липса на статистическа значимост. Статистическите различия между групите ДЗП болни са оценявани с t-тест на Student Fisher. Статистическа значимост е отчитана при p<0.05.

Не се установяват статистически значими разлики между нивата на изследваните показатели при пациентите с PSA под и над граничната стойност от 4 ng/ml.

Не се откриват статистически значими различия в нивата на PSA при разпределение на пациентите според витамин D статуса (“cut-off” стойност за серумен калцидиол 50 nmol/L). Средните нива на PSA за пациентите с оптимални нива на витамин D или недостатъчност (калцидиол ≥ 50 nmol/L) са 4.58 ± 4.12 ng/ml, а за тези с витамин D дефицит са незначимо по-високи – 6.35 ± 4.71 ng/ml. Прави впечатление факта, че стойностите на PSA при пациентите с оптимален и субоптимален витамин D статус са с 14,5% над горнограничната

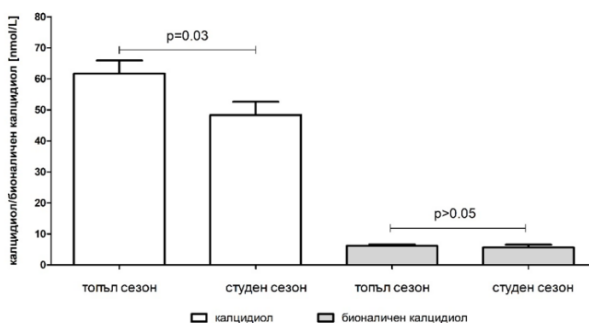
стойност, докато при витамин D дефицитната група това повишение е 58,7%. Макар и незначима, наблюдава се тенденция за по-високи стойности на PSA при витамин D дефицитните болни. Средната стойност на PSA за тази група е с 39% по-висока в сравнение с групата пациенти с по-добър витамин D статус.

Проведеният непараметричен корелационен анализ не показва наличие на причинно следствени връзки между PSA и изследваните показатели: PSA и калцидиол (Spearman $r = -0.01$; $p > 0.05$); PSA и бионаличен калцидиол (Spearman $r = -0.03$; $p > 0.05$); PSA и VDBP (Spearman $r = -0.03$; $p > 0.05$).

Други фактори, влияещи върху витамин D статуса

Сезонни вариации

За да бъдат отчетени сезонните промени във витамин D статуса, дължащи се на различното слънцегреене и излагане на слънце през различните сезони, ДЗП пациентите са стратифицирани в 2 групи според периода на вземане на кръвта за изследване на калцидиол: топъл период, обхващащ месеците от юни до октомври; студен период, включващ месеците от ноември до май. Сезонните вариации в нивата на калцидиол и бионаличен калцидиол са представени на фигура 12.



Фиг. 12. Нива на калцидиол и бионаличен калцидиол през „топлия“ и студения“ период на изследването.

„топъл“ период: от юни до октомври; „студен“ период: от ноември до май; статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$.

Резултатите показват, че броят на пациентите, изследвани през „топлия“ и „студения“ период е приблизително еднакъв, съответно 29 и 25 мъже. Такова равномерно разпределение на пациентите през двата периода с различно слънцегреене и излагане на слънце е предпоставка за по-точна оценка на витамин D статуса. От фигурата е видно статистически значимото намаление в серумния калцидиол през студения период спрямо топлия (48.37 ± 20.76 nmol/L спрямо 61.69 ± 22.69 nmol/L, $p < 0,05$). Подобна тенденция на повишение през топлия период се установява и за биоактивния калцидиол (6.13 ± 2.63 nmol/L спрямо 5.623 ± 2.80 nmol/L, $p > 0,05$). Възможна причина за липсата на статистическа значимост при този показател е по-малката извадка ДЗП пациенти, на които е изследван бионаличния калцидиол (39 души).

Индекс на телесна маса

Поради липофилната природа на калцидиола, логично е да се очаква, че по-високите стойности на индекса на телесна маса (BMI) ще са свързани с по-ниски нива на циркулиращ витамин D. Това даде основание да разпределим ДЗП пациентите според BMI в две групи: с нормално тегло ($BMI < 25$ kg/m²) и с наднормено тегло или обезитет ($BMI \geq 25$ kg/m²) и да сравним техния витамин D статус. Резултатите показват по-високи нива на калцидиол при пациентите с $BMI < 25$ kg/m² спрямо тези с $BMI \geq 25$ kg/m², съответно 59.96 ± 25.34 nmol/L спрямо 52.59 ± 20.22 nmol/L. Разликата не е значима, но се наблюдава тенденция на влошаване на витамин D статуса в увеличаване на BMI.

Андрогенен статус при пациенти с доброкачествени заболявания на простатата

Оценката на андрогенния статус на ДЗП болните е направена въз основа както на серумните нива на тестостерона, така и като са отчитани промените в другите андрогенни хормони – андрогенните прекурсори дехидроепиандростерон сулфат (DHEAs) и андростендион и транспортният плазмен глобулин, свързващ половите хормони (SHBG). Резултатите са представени на таблица 4.

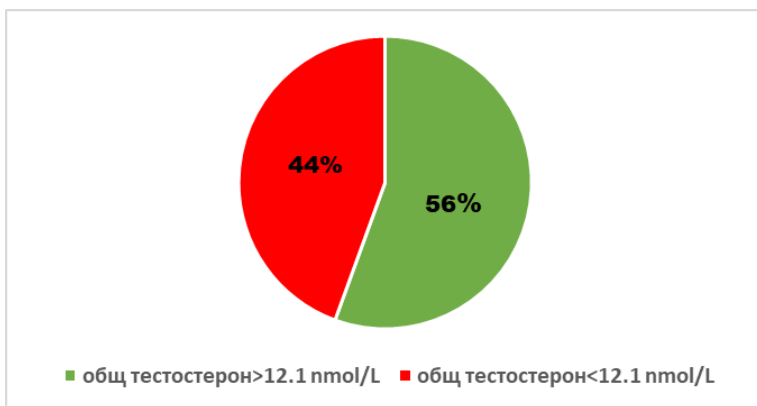
Таблица 4. Средни нива на изследваните андрогени и андрогенни индекси при болни с доброкачествени заболявания на простатата

Показатели	Средно \pm SD (n)	Нормални интервали ⁴
общ тестостерон (nmol/L)	12.80 \pm 4.57 (54)	6.93 - 23.9
свободен тестостерон (pmol/L)	32.08 \pm 10.03 (54)	2.42 - 74.43
андростендион (nmol/L)	5.92 \pm 2.70 (54)	1.04 - 11.83
DHEAs (μ mol/L)	2.31 \pm 0.93 (54)	1.08 - 6.82
SHBG (nmol/L)	72.32 \pm 32.85 (39)	15.0 - 100.0
свободен андрогенен индекс (%)	20.37 \pm 14.94 (39)	-
процент свободен тестостерон (%)	0.25 \pm 0.04 (54)	-
PSA/общ тестостерон	1.76 \pm 2.17 (52)	-

DHEAs – дехидроепиандростерон сулфат; SHBG – плазмен глобулин, свързващ полови хормони; PSA – простатно специфичен антиген; n – брой пациенти.

От таблицата е видно, че средните стойности на изследваните андрогени, както и на SHBG попадат в нормалната област, посочена в съответния търговски кит, с който е проведен анализа. Като “cut-off” стойност за общия серумен тестостерон е използвана 12.1 nmol/L, приета от Клиниката по урология, МБАЛ „Св. Марина“, Варна, а също и в литературата (Lunenfeld et al, 2015) като минимална за поддържане на нормални биологични функции. Разпределението на пациентите според „cut off“ стойността 12.1 nmol/L е представено на фигура 13.

⁴ Нормални интервали за съответните показатели, посочени в използвания за анализ търговски кит



Фиг. 13. Процентно разпределение на ДЗП пациентите според нивата на общия серумен тестостерон

Приета е „cut off“ стойност за общ серумен тестостерон 12.1 nmol/L (Lunenfeld et al, 2015).

Видно е, че по-голямата част от ДЗП пациентите са с нива на общ тестостерон над посочената „cut off“ стойност. От изследваните пациенти 5 души (9%) са с нива под нормалния интервал, посочен в търговския кит (6.93 nmol/L). Не се установяват нива на общ тестостерон над горната граница на нормалния интервал (23.9 nmol/L).

Взаимовръзка между андрогени и биохимични маркери за простатна хиперплазия

PSA и андрогенен статус

За да се изследва взаимовръзката на андрогените с утвърдения маркер за пролиферативен процес в простатата, пациентите са разпределени според нивата на PSA – под и над референтната горногранична стойност от 4 ng/ml. Резултатите са представени на таблица 5.

Таблица 5. Промени в нивата на изследваните андрогени при болни с доброкачествени заболявания на простатата според PSA

Показатели	ДЗП пациенти с PSA < 4ng/ml Хсредно ± SD (n)	ДЗП пациенти с PSA ≥ 4ng/ml Хсредно ± SD (n)	p
общ тестостерон (nmol/L)	12.83 ± 4.990 (24)	12.76 ± 4.27 (28)	ns
свободен тестостерон (pmol/L)	32.34 ± 11.86 (24)	31.60 ± 7.95 (28)	ns
андростендион (nmol/L)	6.35 ± 3.14 (24)	5.45 ± 2.26 (28)	ns
DHEAs (μmol/L)	2.40 ± 0.97 (24)	2.26 ± 0.93 (28)	ns
SHBG (nmol/L)	68.63 ± 27.40 (17)	74.60 ± 38.57 (20)	ns
свободен андрогенен индекс (%)	18.34 ± 8.58 (17)	22.42 ± 19.20 (20)	ns
процент свободен тестостерон (%)	0.25 ± 0.04 (24)	0.26 ± 0.05 (28)	ns
PSA/общ тестостерон	0.46 ± 0.31 (24)	2.87 ± 2.45 (28)	0.0003

DHEAs – дехидроепиандростерон сулфат; SHBG - глобулин свързващ половите хормони; ns – отсъствие на статистическа значимост; n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0,05$.

Не се откриват статистически значими разлики в изследваните андрогени между двете групи пациенти с PSA под и над 4ng/ml.

След стратифициране на пациентите според „cut off“ стойността 12.1 nmol/L за общия серумен тестостерон, като основен андроген определящ андрогенния статус, са изследвани промените в средните нива на PSA. Не се установиха статистически значими различия в средните стойности на PSA между групите с нива на тестостерон под и над 12.1 nmol/L – 5.398 ± 4.892 ng/ml спрямо 5.371 ± 4.046 ng/ml.

Резултатите от проведения непараметричен корелационен анализ не показваха наличие на причинно-следствени връзки между PSA и отделните андрогени: PSA и общ тестостерон (Spearman $r = 0.04$; $p > 0,05$); PSA и свободен тестостерон (Spearman $r = -0.04$; $p > 0,05$); PSA и андростендион (Spearman $r = -0.12$; $p > 0,05$), както и PSA и DHEAs (Spearman $r = -0.12$; $p > 0,05$). Не е установена корелационна зависимост и за SHBG (Spearman $r = 0.25$; $p > 0,05$).

Други фактори, влияещи върху андрогенния статус

Сезонни вариации

Въпросът за сезонните промени в тестостерона е предмет на дискусии в литературата. Данните за наличие или отсъствие на такава сезонна зависимост са разнопосочни и противоречиви. От друга страна, в редица моделни системи е установено, че витамин D, за който установихме значими сезонни промени, повлиява продукцията на тестостерон. Всичко това обоснова изследването на сезонни вариации при андрогените, предмет на настоящото проучване. Пациентите са разпределени в две групи, аналогични с тези при изследване на сезонните промени в нивата на калцидиол: пациенти, изследвани през т.н. „топъл период“, обхващащ месеците юни – октомври и през т.н. „студен период“ от ноември до май. Резултатите са представени на таблица 6.

Таблица 6. Средни нива на общ и свободен серумен тестостерон през „топъл“ и „студен“ сезон на вземане на кръвта за изследване

Показател	ДЗП пациенти, изследвани през „топъл“ сезон Хсредно \pm SD (n)	ДЗП пациенти, изследвани през „студен“ сезон Хсредно \pm SD (n)	p
общ тестостерон (nmol/L)	12.41 \pm 4.66 (29)	13.26 \pm 4.51 (25)	ns
свободен тестостерон (pmol/L)	32.92 \pm 10.90 (29)	31.12 \pm 9.04 (25)	ns

„топъл“ сезон: от юни до октомври; „студен“ сезон: от ноември до май; ns – отсъствие на статистическа значимост; n – брой пациенти.

Статистическите различия между изследваните групи ДЗП болни са оценявани с t-тест на Student Fisher. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$.

От таблицата е видна липсата на значими различия в нивата на общия и на свободния тестостерон през двата периода на изследването. Останалите изследвани стероиди също не показват сезонни вариации.

Индекс на телесна маса

Добре известно е, че съществува обратна връзка между циркулиращи нива на тестостерон и BMI. Това ни даде основание да изследваме промените в средните нива на тестостерона и другите андрогени при ДЗП

болни с BMI <25 kg/m² и такива с наднормено тегло и обезитет (BMI ≥ 25 kg/m²).

Резултатите показват тенденция за понижаване както на общия, така и на свободния тестостерон при пациентите с BMI ≥ 25 kg/m² в сравнение с групата мъже с нормално телесно тегло (общ тестостерон: 11.63 ± 4.84 nmol/L спрямо 13.62 ± 4.90 nmol/L, p>0.05; свободен тестостерон 29.11 ± 11.05 nmol/L спрямо 35.06 ± 11.18 nmol/L, p>0.05). За другите андрогени също се забелязва тенденция на по ниски нива на андростендион и DHEAs за болните с наднормено тегло, а при SHBG се установява значимо по-ниска средна стойност за болните с BMI ≥ 25 (54.51 ± 17.40 nmol/L спрямо 94.35 ± 39.90 nmol/L, p=0.01).

Взаимовръзка между витамин D и андрогени

Витамин D и андрогените са стероиди, които имат общ метаболитен прекурсор холестерол. В моделни системи е установено, че биосинтезата и функциите на калцитриол и андрогените взаимно се повлияват (Hofer et al, 2014). Това ни насочи да изследваме дали витамин D статусът би повлиял нивата на андрогените и дали андрогенният статус е свързан с промени във витамин D статуса.

Пациентите са разпределени според витамин D статуса като е използвана “cut off” стойността за серумен калцидиол от 50 nmol/L и са изследвани промените в андрогените (Табл. 7).

Таблица 7. Сравнение в нивата на андрогените при ДЗП пациенти според витамин D статус

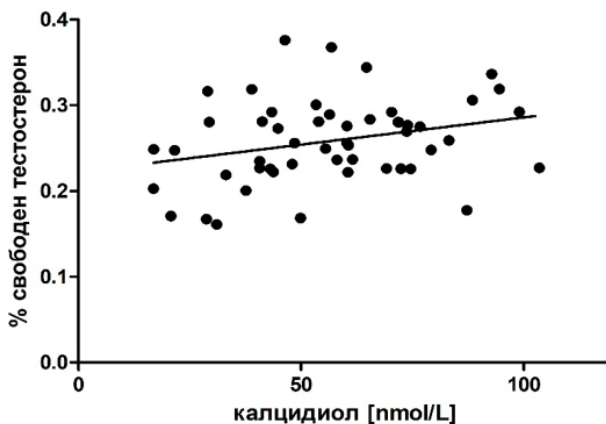
Показатели	ДЗП пациенти с нива на серумен калцидиол >50 nmol/L Хсредно ± SD (n)	ДЗП пациенти с нива на серумен калцидиол <50 nmol/L Хсредно ± SD (n)	p
общ тестостерон (nmol/L)	12.28 ± 4.22 (30)	13.78 ± 4.84 (23)	ns
свободен тестостерон (pmol/L)	32.59 ± 10.23 (30)	31.96 ± 9.86 (23)	ns
андростендион (nmol/L)	5.590 ± 2.30 (30)	6.275 ± 3.18 (23)	ns
DHEAs (μmol/L)	2.328 ± 1.01 (30)	2.271 ± 0.85 (23)	ns
SHBG(nmol/L)	71.99 ± 28.57 (25)	72.67 ± 37.63 (19)	ns
свободен андрогенен индекс (%)	20.06 ± 18.56 (20)	20.69 ± 10.36 (19)	ns
процент свободен тестостерон (%)	0.27 ± 0.04 (30)	0.24 ± 0.05 (23)	0.03
PSA/общ тестостерон	1.43 ± 1.36 (29)	2.09 ± 2.90 (22)	ns

DHEAs - дехидроепиандростерон сулфат; SHBG – плазмен глобулин, свързващ полови хормони; ns – отсъствие на статистическа значимост; n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$.

Статистически значими различия се откриват единствено в нивата на процента свободен тестостерон между ДЗП болните с оптимален витамин D статус (над 50 nmol/L) и с витамин D дефицит (под 50 nmol/L). Сравнението в нивата на калцидиол между групата пациенти с общ тестостерон над 12.1 nmol/L и под тази гранична стойност също не показва статистически значими различия между витамин D статуса на двете групи: съответно, 56.80 ± 20.41 nmol/L спрямо 54.79 ± 24.52 nmol/L, $p > 0.05$.

В последните години редица проучвания въвеждат т. нар „композитни“ показатели като съотношенията PSA/общ тестостерон, свободен андрогенен индекс (общ тестостерон/SHBG), процент свободен тестостерон с цел по-добра оценка на риска от простатен карцином (Garcia-Cruz et al, 2012).

Проведеният корелационен анализ показва статистически значима корелация между калцидиол и процента свободен тестостерон (фиг. 14). За останалите изследвани андрогени и техни индекси като PSA/общ тестостерон, общ тестостерон/SHBG подобни корелационни зависимости не са установени.



Фиг.14. Корелация между серумните нива на калцидиол и процента свободен тестостерон при ДЗП пациенти.

Spearman $r = 0.29$; $p = 0.03$; процентът свободен тестостерон е изчислен от съотношението свободен тестостерон [nmol/L] : общ тестостерон [nmol/L] $\times 100$.

Обсъждане на резултатите

Витамин D статус

В последните години ролята на витамин D извън неговите калциемични ефекти е във фокуса на редица проучвания. Това от една страна е свързано с епидемичните размери на витамин D дефицита, а от друга с разкриването на неговата роля в патогенезата на все повече заболявания. Не правят изключение и заболяванията на простатата. По данни на Ендокринологичното дружество и Института по медицина, САЩ 34,3% от мъжете с урологични проблеми са със субоптомални нива на витамин D под 50 nmol/L (Espinoza et al, 2013).

Калцидиол, циркулиращата форма на витамин D, е приета като основен серумен маркер за определяне на витамин D статуса на индивида (Holick et al, 2009, Binkley et al, 2012, Al-oanzi et al, 2006). Серумни нива на калцидиол от 50nmol/L служат като репер за дефиниране на състояние на витамин D дефицит, когато нивата на циркулиращата форма на витамин D са под 50nmol/L и състояние на витамин D „достатъчност“ при серумен 25-хидрокс витамин D над 50 nmol/L (Zhang et al, 2010; Garland et al, 2006; Giovannucci et al, 2008; Hollis et al, 2011). Тази класификация понастоящем широко се използва в ендокринологията и се основава единствено на нуждите от витамин D във връзка с костното здраве. В последните години във връзка с установената пандемия на витамин D дефицита дефинирането на витамин D статуса се прецизира като се обособиха поднивата тежък витамин D дефицит (< 25 nmol/L), лека изява на дефицит (25-50 nmol/L), витамин D недостатъчност (50-75 nmol/L) и оптимален витамин D статус (>75 nmol/L) (Holick et al, 2011). При това по-прецизно дефиниране на витамин D на статуса, освен ролята на витамин D за костното здраве, се отчитат и некалциемичните ефекти на калцитриола, изявяващи се при оптимални нива на калцидиол над 75 nmol/L и свързани с антипролиферация, проапоптоза и про-диференциране на клетки от различни тъкани между които и простатна жлеза.

При изследваните ДЗП пациенти е установена средна стойност на серумния калцидиол, попадаща в областта на витамин D недостатъчност (50 – 75 nmol/L). Подобни резултати за витамин D недостатъчност съобщава проучване в Швеция върху 184 мъже на възраст 72 - 76 години

с ДПХ (Haghshneno et al, 2013). Получената от тях средна стойност на калцидиол от 64.37 nmol/L попада също в областта на витамин D недостатъчност. Авторите посочват серумният калцидиол като независим фактор, свързан с ДПХ. Процентното разпределение на ДЗП болните според витамин D статуса показва, че 43% от изследваните мъже са с витамин D дефицит (нива <50 nmol/L), а само 15% са с оптимални стойности (>75 nmol/L) като при това, пациентите са равномерно разпределени според сезона на вземане на кръвта. Подобно проучване върху 322 възрастни китайци с доброкачествени заболявания на простатата открива витамин D дефицит при 71% от изследваните пациенти (Zhang et al, 2016), стойност по-висока от нашия резултат. Възможна причина за това несъответствие е неотчитането на сезонните вариации във витамин D статуса, също така расовите различия, свързани с биосинтеза на витамин D в кожата.

Все още патогенезата на доброкачествените заболявания на простатата не е напълно изяснена, но все повече данни говорят в полза на предположението, че витамин D дефицитът играе съществена роля като инициращ фактор на тези заболявания. Простатните епителни клетки експресират ензими за биосинтеза на биологично активния калцитриол и витамин D рецептор, отговорни за изявата на антипролиферативните и антиинфламаторни ефекти на витамин D в простатна жлеза. При дефицит на калцидиол се индуцират възпалителни и пролиферативни процеси в простатната жлеза, патогенетични елементи на ДПХ (Zhang et al, 2016). Освен това, витамин D дефицитът иницира оксидативен стрес в простатна жлеза, допълнително допринасящ за развитието на ДПХ (Junn et al, 2000)

В последните години като нов маркер за достъпността на калцидиол се определя бионаличния калцидиол, който сумарно представлява двете фракции на калцидиола – биологично активната, свободна фракция и слабосвързаната с плазмения албумин. Бионаличният калцидиол зависи от плазмените концентрации на албумина, VDBP и калцидиола. Той отразява максималното количество калцидиол, който може да изяви биологична активност (Pandian et al, 2015). Проучванията, касаещи промените в бионаличния калцидиол, като по-прецизен индикатор на витамин D статуса, са изключително малко и основно са насочени към костното здраве. Някои от тези изследвания оценяват бионаличния

калцидиол като по-добър маркер от тоталния 25-хидроксивитамин D при оценка на костното здраве (Pandian et al, 2015). Нашите резултати за промените в бионаличния калцидиол са едни от първите при пациенти с бенигнени и малигнени заболявания на простатата.

Витамин D статус и пролиферация на простатата

Основният кръвен маркер, широко използван в клиничната практика и оценяващ пролиферативни и деструктивни процеси в простатната жлеза е PSA. Той е каликреиноподобна протеаза, която се синтезира в епителните клетки на простатната жлеза, попада в кръвообращението след деструкцията им, което дава възможност да се определи PSA в серума (Петкова и съавт., 2014). При здрави мъже нивата на PSA са много ниски, като референтните стойности след 45 годишна възраст са до 4ng/ml (Dall'oglio et al, 2005). Активно протичащите процеси на пролиферация на простатата и свързаното с това нарастване на жлезата при ДЗП води до повишение в стойностите на PSA, което се потвърждава и от нашите резултати. Предвид антипролиферативния ефект на калцитриол, логично е да се очаква, че при ДЗП пациенти с дефицит на витамин D стойностите на PSA ще са повишени.

Резултатите от нашето проучване показват тенденция на повишение на PSA при пациентите с дефицит на витамин D спрямо тези с нива на калцидиол над 50 pmol/L. Освен това, установената от нас тенденция за по-нисък серумен калцидиол при пациентите с PSA в т.нар. „сива зона“ (4 – 10ng/ml) спрямо болните с PSA в референтни граници (до 4 ng/ml) допълнително подкрепя предположението за обратна зависимост между PSA и серумен калцидиол при изследваните мъже. В подкрепа на нашите резултати е изследване на Zhang et al, 2016, които съобщават значимо по-високи стойности на PSA при ДПХ болни с витамин D дефицит спрямо пациенти с оптимални нива на калцидиол (3.28 ng/ml спрямо 2.55 ng/ml, $p < 0.01$).

Предполага се, че възможните механизми на антипролиферативното действие на витамин D и наблюдаваната обратна зависимост с PSA включват инхибиране на сигналния път RhoA/ROCK, стимулиращ продукцията на IL-8, важен стимулатор на клетъчната пролиферация при

ДПХ, потискане на възпалението, на ниво експресия на COX-2 и PGE2, индуциране на апоптоза (Espínosa et al, 2013).

Добре известно е, че PSA, като лабораторен параметър, е органоспецифичен маркер, но не и специфичен по отношение на вида заболяване, засягащо този орган. Това е едно обяснение на липсата на корелация между PSA и калцидиол или бионаличен калцидиол при изследваните пациенти. В съответствие с този резултат е проучване, съобщаващо липса на статистически значими промени в нивата на PSA при здрави мъже от негроидната раса на средна възраст 49 години, суплементирани в продължение на три месеца с витамин D (Chandler et al, 2014).

Андрогенен статус

Тестостеронът е основният андроген, отговорен за растежа на простатната жлеза. Точният молекулен механизъм по който той влияе на разрастването на жлезата е все още ненапълно изяснен. Предполага се, че тестостеронът активира андрогенния рецептор в простатните клетки, което запуска сигнални пътища, стимулиращи транскрипцията на андроген-зависими гени. В резултат се продуцират и секретират растежни фактори като инсулиноподобен растежен фактор 1, епидермален растежен фактор, протеини, свързани с фибробластния растежен фактор и растежен фактор за кератиноцити (Jarvis et al, 2015). Това индуцира пролиферативни процеси и нарастване на жлезата. По отношение на промените в останалите андрогени при ДЗП пациенти литературните данни са изключително оскъдни.

Нашите резултати показват, че изследваните андрогени, включително и SHBG, са в референтните граници. Средната стойност за общия тестостерон (12.80 nmol/L) е близка до „cut off“ стойността 12.1 nmol/L. Сходни с нашите са резултатите на Haghshneno et al (2013), които при проучване върху 155 пациенти с ДПХ на възраст 72-76 години също установяват нива на общ тестостерон незначимо различаващи се от тази „cut off“ стойност (Haghshneno et al, 2013). Подобни са и резултатите на Sayeed et al. (2016), съобщаващи стойности на общ серумен тестостерон в референтни граници при болни с ДПХ (Sayeed et al 2016).

В литературата данните за промените в нивата на серумния тестостерон в зависимост от PSA при пациенти с доброкачествени заболявания на простатата са малко и твърде разнопосочни и противоречиви. Някои проучвания откриват повишени нива на тестостерон (Gann et al, 1996), други намалени (Mearini et al 2008), трети не намират промени в този показател (Usoro et al 2015). Нашите резултати показват ясна тенденция за намаляване на общия и свободния тестостерон с увеличаване на PSA. В зависимост от стойностите на тестостерона под и над 12.1 nmol/L не се откриват разлики в средните нива на PSA. Не се установява и корелация между PSA и общия тестостерон. Подобни на нашите резултати са тези на Elzanaty et al (2017), които също не откриват разлики в нивата на PSA при стойности на тестостерон под и над 12 nmol/L, както и корелация между тези два показателя ($r = 0.05$, $p > 0.05$) при здрави възрастни мъже на възраст от 46 до 60г. (Elzanaty et al, 2017). Друго проучване върху 116 болни с ДЗП също не съобщава за разлики в нивата на общия тестостерон в зависимост от PSA (Usoro et al, 2015).

Възможно обяснение на отсъствието на значими промени в нивата на тестостерона в зависимост от PSA при доброкачествена хиперплазия на жлезата е, че епителните клетки на простатната жлеза са все още добре диференцирани и осигуряват нормална регулация на ензимите от андрогенния метаболизъм.

Витамин D и андрогени

Редица *in vitro* и *in vivo* проучвания в моделни системи установяват, че витамин D активира генната експресия на ензими, свързани със синтезата на андрогени (Hofer et al, 2014). Не така категорични са данните от подобни проучвания върху хора. Изследванията относно влиянието на витамин D статуса и неговите промени върху андрогенезата и нивата на андрогени при пациенти със заболявания на простатата са твърде малко на брой, а резултатите разнопосочни.

Нашите резултати не показват различия в нивата на изследваните андрогени в зависимост от витамин D статуса (дефицитен или оптимален), но ние откриваме значима позитивна корелация между калцидиол и процента свободен тестостерон (Spearman $r = 0.29$, $p = 0.03$). В съответствие с нашите резултати е проучване при здрави мъже на средна възраст 40 години доказващо слаба, но значима положителна

корелация между калцидиол и общ тестостерон ($r = 0.137$, $p < 0.001$), както и между калцидиол и свободен тестостерон ($r = 0.103$, $p = 0.008$). При мъжете с витамин D дефицит авторите установяват 2.65 пъти по-голям риск от хипогонадизъм (Tak et al, 2015). В подкрепа на нашите данни са и резултатите на Lee et al (2012), които също не намират разлики в нивата на общ и свободен тестостерон при здрави мъже на възраст 40-79 години с дефицит (<50 nmol/L) и субоптимални нива на витамин D (50-75 nmol/L) (Lee et al, 2012, Lerchbaum et al, 2014).

Сезонност

Добре документирани са сезонните вариации в серумните нива на калцидиола. Това се дължи на промени в слънцегреенето, което има пряко действие върху ендогенния биосинтез на витамин D (Klingberg et al, 2015, Wehr, 2010). Нашите данни са в подкрепа на резултатите от други изследвания, демонстриращи подобрен витамин D статус на пациентите през лятото и ранна есен спрямо зимния и пролетния сезон. Установеният витамин D дефицит при ДЗП пациентите се компенсира през периода на повишено слънцегреене и излагане на слънце като се достигат нива на калцидиол над 50 nmol/L.

Не така еднозначни са данните за сезонните промени при андрогените. Някои автори установяват сезонни промени в нивата на тестостерона, сходни с тези при калцидиола (Wehr, 2010), други (Svartberg et al, 2003) намират бимодално сезонно разпределение на общия и свободния тестостерон с пик през есента и спад през лятото при 1548 мъже, живеещи в северна Норвегия. В друго проучване, проведено в Сан Диего, Калифорния върху 915 мъже същите автори не намират сезонни промени в нивата на тестостерона. Те предполагат, че причина за разнопосочните резултати е различието в климата и в сезонните вариации на мелатонина в двата изследвани региона, северна Норвегия и Сан Диего, Калифорния (Svartberg et al, 2004). Проучване на Anderson et al (2003) върху мъже от Дания установява сезонни промени в тестостерона с пик през лятото и надир през зимата и ранна пролет, но не и в другите андрогени (Anderson et al, 2003). В друго изследване, проведено върху 11000 мъже от Северна Калифорния е установена значима сезонна вариация в свободния тестостерон с пик през лятото и есента, но не и в нивата на DHEA (Moskovic et al, 2012). Тъй като SHBG е позитивно асоцииран с

промените в тестостерона, може да се предполага наличие на сезонни вариации и в нивата на SHBG. Изключително малко са проучванията в тази насока, а резултатите са разнопосочни. Едно проучване установява пик в SHBG през януари (Valero-Polti et al, 1998), при друго изследване той е през есента (Svartberg et al, 2003). Ние не установяваме сезонни вариации на тестостерона и другите изследвани андрогени. Възможна причина е, че цитираните проучвания са при здрави мъже на възраст под 30 години, фактори от съществено значение за андрогеногенезата. Друга възможна причина е, че вариациите в нивата на андрогените зависят от редица екзогенни и ендогенни фактори като денонощни и сезонни вариации в мелатонина, стила на живот, географска локация, регулация по оста хипоталамус- хипофиза-тестиси и витамин D статуса (Smith et al, 2013).

Индекс на телесна маса

Редица данни в литературата посочват обратна корелация между увеличеното количество мастна тъкан при индивиди с наднормено тегло и обезитет и нивата на серумния калцидиол (Gonzalez-Molero et al, 2013). Увеличаването на BMI с единица води до снижаване на циркулиращия калцидиол с 1.15% (Vimalaswaran et al, 2013).

Молекулните механизми, водещи до витамин D дефицит, свързан с наднормено тегло и обезитет са все още не напълно изяснени. Предполага се, че натрупването на мастна тъкан играе роля на резервоар за липофилния калцидиол, което води до снижаване на неговите циркулиращи нива и ниска бионаличност. Проучвания върху опитни животни показват, че 33% от циркулиращия калцидиол се натрупва в мастната тъкан (Cipriani et al, 2014). Адипозната тъкан регулира и е регулирана от нивата на калцидиол. Това се основава на факта, че адипоцитите експресират витамин D рецептор, 1-алфа хидроксилаза и 24-хидроксилаза, а от друга страна калцитриолът потиска адипогенезата, инхибирайки PPAR γ (Vinh quôc et al, 2013).

По отношение на серумните нива на тестостерона, ние установяваме пониски нива на общ и свободен тестостерон при пациентите с наднормено тегло и обезитет. Подобни резултати съобщава и проучване върху 3219 мъже с наднормено тегло и обезитет, показващи значимо намалени общ и свободен тестостерон спрямо индивидите с нормално тегло (Wu et al,

2008). Предполага се, че намалението на общия тестостерон е последица от пониженият SHBG, поради свързаната с obesity хиперинсулинемия. Освен това, висцералната мастна тъкан освобождава про-инфламаторни цитокини, които инхибират хипоталамо-хипофизарно-тестикулната ос на няколко нива и водят до потисната продукция на андрогени (Ng-Tang et al, 2016). От друга страна, ниският тестостерон индуцира адипоцитна дисфункция и свързаното с нея акумулиране на висцерална мастна тъкан и затлъстяване (Mah et al, 2010).

II. Пациенти с простатен карцином

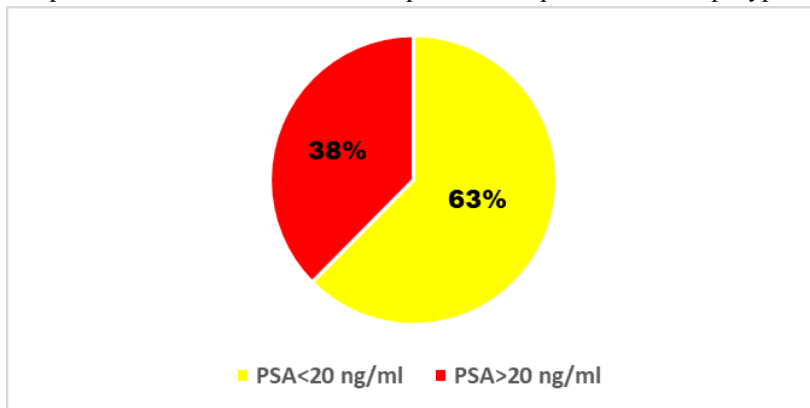
Обща характеристика на пациентите с простатен карцином

Групата пациенти с простатен карцином (PCa) включва 88 мъже на възраст между 52 и 84 години (средна възраст 66.76 ± 6.25 години). Средната стойност на индекса телесна маса (BMI) при тези болни е $27.53 \pm 4.12 \text{ kg/m}^2$.

Простатно специфичен антиген

Средната стойност на PSA за общата група болни с простатен карцином е $30.99 \pm 42.20 \text{ ng/ml}$, 7,7 пъти над референтните граници (до 4.0 ng/ml) и 5,8 пъти над средната стойност на този показател за ДЗП болните ($5.38 \pm 4.39 \text{ ng/ml}$).

Според нивата на PSA PCa пациентите са разпределени в две подгрупи. Като гранична стойност на PSA за риска от костни метастази е приета стойността от 20 ng/ml (Kamaleshwaran et al, 2012). Стойности на PSA над 20 ng/ml са индикация за повишен риск от костни метастази. Разпределението на пациентите според PSA е представено на фигура 15.



Фиг. 15. Процентно разпределение на пациентите с простатен карцином според нивата на PSA
Като гранична стойност на PSA за риска от костни метастази е приета 20 ng/ml (Kamaleshwaran et al, 2012)

От фигурата е видно, че по-голям е броят на пациентите с нива на PSA под 20 ng/ml (55 болни), спрямо тези с PSA над 20 ng/ml (33 болни).

Клиничен стадий на простатния карцином

Разпределението на пациентите според клиничния стадий на заболяването, оценяван според TNM класификацията (EUA Guideline, 2016) е представено на таблица 8.

Таблица 8. Разпределение на пациентите с простатен карцином според клиничния стадий на заболяването

T1+T2		T3+T4	
74.69%		25.30%	
N0	N1	N0	N1
98.36%	1.63%	80.95%	19.04%
M0	M1	M0	M1
96.72%	3.27%	100%	0%

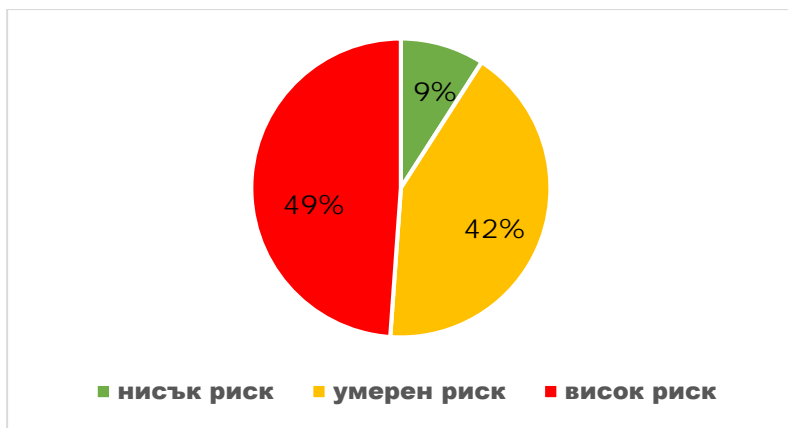
Клиничният стадий на заболяването е оценяван според TNM класификацията (EUA Guideline, 2016). T1+T2 – локализиран простатен карцином; T3+T4- авансирал простатен карцином; N0- регионалните лимфни възли не са засегнати; N1- регионалните лимфни възли са засегнати; M0- не се откриват далечни метастази; M1- наличие на далечни метастази.

Резултатите показват превалиране на случаите с локализиран простатен карцином (T1+T2) (61 болни), спрямо тези с авансирал рак на простатата (T3+T4) (21 болни). Според степента на метастазиране, над 90% от пациентите в клиничен стадий T1 и T2 са без засягане на регионални лимфни възли (60 души) и с липса на далечни метастази (59 души). Единични са случаите със засегнати лимфни възли (1 болен) и наличие на метастази (2 болни). При групата пациенти с простатен карцином в стадий T3 и T4 се наблюдава същата тенденция.

Риск от биохимичен рецидив (BCR)

Рискът от биохимичен рецидив при пациентите с простатен карцином е определен според препоръките на Европейското дружество по Урология от 2016 по стойностите PSA, TNM-класификацията и скората на Gleason

(EUA, Guideline, 2016). Процентното разпределение на пациентите според BCR е представено на фигура 16.



Фиг. 16. Процентно разпределение на пациентите с простатен карцином според риска от биохимичен рецидив (BCR)

Най-голям е броят на пациентите с висок BCR (43 души), следвана от болните с умерен риск (37 души), и пациентите с нисък BCR (8 души).

Степен на метастазиране

Определянето на степента на метастазиране на простатния карцином е извършено по следните клинични параметри: **SVI** (засягане на семенни мехурчета), **LNI** (засягане на лимфни възли), **EPE** (разпространение на тумора извън простатната жлеза) и **LAD** (локализиран или авансирал простатен карцином) (EUA Guideline, 2016) (таблица 9).

Таблица 9. Процентно разпределение на пациентите според критериите за метастазиране на простатния карцином

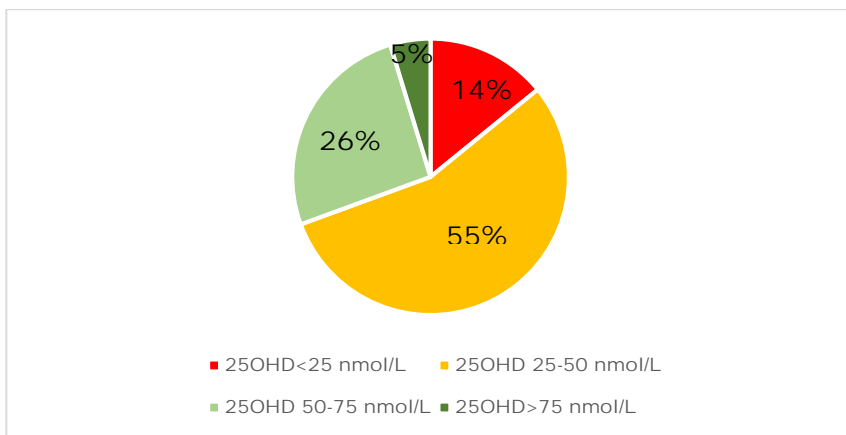
Клиничен критерий	Процент пациенти
SVI	
със засягане	14.77%
без засягане	85.22%
LNI	
със засягане	7.95%
без засягане	92.04%
LAD	
локализиран	72.72%
авансирал	27.27%
EPE	
туморът не е разпространен извън простатата	26.13%
туморът е разпространен извън простатата	73.86%

SVI - засягане на семенни мехурчета; LNI - засягане на лимфни възли; EPE - разпространение на тумора извън простатната жлеза; LAD - локализиран/авансирал простатен карцином. Степента на метастазиране е оценявана по критериите на EUA Guideline, 2016.

Най-голям е броят на пациентите без засягане на лимфни възли (81 души) и семенни мехурчета (75 души). По-голямата част от болните са с локализиран тумор в простатната капсула (64 случая).

Оценка на витамин D статуса на пациентите с простатен карцином

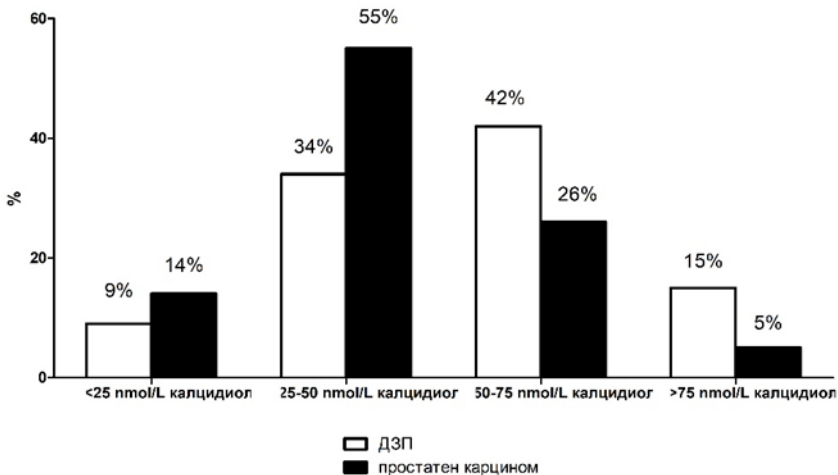
Процентното разпределение на пациентите с рак на простатата според витамин D статуса, определен според критериите на Европейското дружество по ендокринология (Holick et al, 2011) е представени на фигура 17.



Фиг. 17. Разпределение на пациентите с простатен карцином според витамин D статуса: серумен калцидиол (25OHD) < 25 nmol/L - тежък дефицит; серумен калцидиол (25OHD) 25 nmol/L - 50 nmol/L - лек дефицит; серумен калцидиол (25OHD) 50 nmol/L - 75 nmol/L - витамин D недостатъчност; с серумен калцидиол (25OHD) > 75 nmol/L - оптимален витамин D статус. Витамин D статусът е определен според критериите на Европейското дружество по ендокринология (Holick et al, 2011).

От фигурата е видно, че най-голям е броят на пациентите с лекостепенен витамин D дефицит (47 болни), следвани от тези с витамин D недостатъчност (22 болни). Само четирима от болните с простатен карцином са с оптимални нива на калцидиол над 75 nmol/L, достатъчни за изява на некалциемичните ефекти, а 12 РСa болни са с тежък витамин D дефицит, нива на калцидиол под 25 nmol/L.

В сравнение с болните с доброкачествени заболявания на простатата витамин D статусът на РСa пациентите е значително влошен. Броят на РСa болните с оптимален витамин D статус (калцидиол > 75 nmol/L) е 5 пъти по-малък спрямо този в ДЗП групата, 1,6 пъти е по-висок процентът болни с витамин D недостатъчност или дефицит (калцидиол < 50 nmol/L) при раково болните спрямо случаите с бенигнни заболявания. Приблизително 70% от болните с простатен карцином са с дефицит на витамин D спрямо 43% за ДЗП групата (фиг. 18).



Фиг. 18. Сравнение (в проценти) на витамин D статуса на болните с доброкачествени простатни заболявания и с простатен карцином
ДЗП – доброкачествени заболявания на простатата

Средните стойности на калцидиол, бионаличен калцидиол и VDBP, използвани за сравнение на витамин D статуса на болните с простатен карцином с този при пациентите с доброкачествени заболявания на простатата са представени на таблица 10.

Таблица 10. Средни стойности на калцидиол, бионаличен калцидиол и VDBP при пациенти с бенигнени и малигнени заболявания на простатата

Показатели	ДЗП болни Хсредно ± SD (n)	РСa болни Хсредно ± SD (n)	p
калцидиол (nmol/L)	56.63 ± 21.71 (52)	42.85 ± 18.88 (85)	0.0001
бионаличен калцидиол (nmol/L)	6.00 ± 2.65 (39)	5.040 ± 3.41 (62)	0.01
VDBP (mg/L)	304.00 ± 82.86 (40)	303.6 ± 79.90 (64)	ns

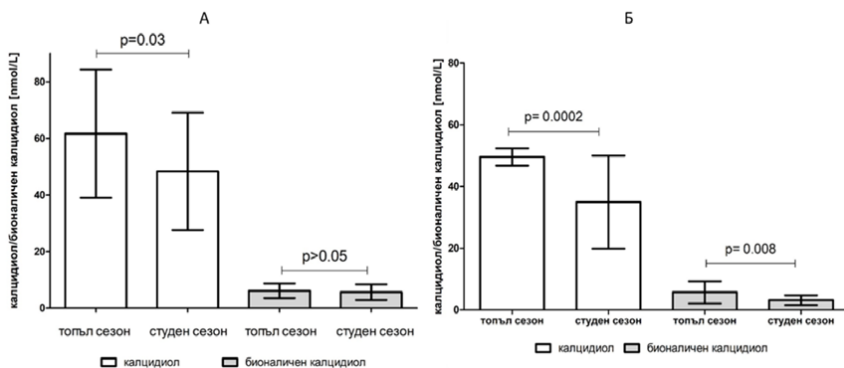
VDBP- витамин D свързващ глобулин; ДЗП- доброкачествени заболявания на простатата; РСa – простатен карцином; ns – статистически незначими разлики, $p > 0.05$; n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$.

Резултатите показват статистически значимо по-ниски стойности на серумния калцидиол при РСa спрямо ДЗП болните ($p < 0.001$). Средните стойности на калцидиола при раково болните пациенти са с 32% по-ниски от тези при ДЗП болните и са под 50 nmol/L, говорещо за витамин D дефицит и невъзможност за изява на некалциемичните ефекти на калцитриол. Подобни са промените в бионаличния калцидиол, който е с 19% по-нисък в РСa спрямо ДЗП групата ($p < 0.05$). Не се откриват статистически значими различия за средните нива на VDBP между болните с малигнени и бенигнени заболявания на простатата.

Влияние на сезона върху витамин D статуса

За да бъдат отчетени сезонните промени във витамин D статуса, дължащи се на различното слънцегреене и излагане на слънце през различните сезони, пациентите са стратифицирани в 2 групи според периода на вземане на кръвта за изследване на серумен калцидиол и бионаличен калцидиол: „топъл сезон“, обхващащ месеците от юни до октомври; „студен“ сезон – месеците от ноември до май. Сезонните вариации в нивата на калцидиол и бионаличен калцидиол за групата болни с

простатен карцином, в сравнение с ДЗП болните са представени на фигури 19А и 19Б.



Фиг. 19. Влияние на сезона на вземане на кръвта върху нивата на калцидиол и бионаличен калцидиол за болните с простатен карцином (А) и с доброкачествени заболявания на простатата (Б).

„Топъл сезон“: от юни до октомври; „студен“ сезон: от ноември до май. Стойностите са представени като $\bar{x} \pm \text{SD}$. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0,05$.

Данните показват изразена сезонна вариация за серумния калцидиол. Средната стойност на калцидиол при болните с простатен карцином е статистически значимо по-висока през „топлия“ сезон спрямо „студения“ ($49.56 \pm 19.33 \text{ nmol/L}$ спрямо $34.94 \pm 15.06 \text{ nmol/L}$, $p < 0,001$). През периода късна есен – зима – пролет стойностите на калцидиола са близки до долно граничната стойност за витамин D дефицит, след което през периода лято - ранна есен нарастват с 42% и почти достигат горно граничната стойност от 50 nmol/L . Въпреки това, те остават значимо по-ниски от съответните стойности за калцидиол при ДЗП пациентите ($49.56 \pm 19.33 \text{ nmol/L}$ спрямо $61.69 \pm 22.69 \text{ nmol/L}$, $p < 0.015$). Тези сезонни промени в нивата на калцидиола са по-силно изразени при РСa спрямо ДЗП болните като процентното повишение в нивата на серумния калцидиол през „топлия“ период е съответно, 42% спрямо 25%.

Бионаличният калцидиол показва по-изразени и статистически значими ($p < 0.05$) сезонни промени при РСa групата. Стойностите на този показател нарастват с 82% през „топлия“ период спрямо нивата му през „студения“ ($5.70 \pm 3.62 \text{ nmol/L}$ спрямо $3.13 \pm 1.59 \text{ nmol/L}$, $p < 0,05$), докато

при болните с доброкачествени простатни заболявания това сезонно увеличение е само 9% и остава статистически незначимо (6.13 ± 2.63 nmol/L спрямо 5.623 ± 2.80 nmol/L, $p > 0.05$).

Не се установяват сезонни промени в плазмения транспортен протеин VDBP (303.2 mg/L спрямо 303.4 mg/L, $p > 0.05$).

Неотчитането на сезонните промени във витамин D статуса може да бъде причина за изкривяване на резултата. В настоящо изследване броят на РСa болните, изследвани през „топлия“ сезон (46 пациента) е приблизително еднакъв с този през „студения“ сезон (42 пациента), което изключва изкривяване на резултата.

Влияние на индекса на телесна маса (BMI) върху витамин D статуса

Друг фактор, повлияващ витамин D статуса е BMI. Поради липофилната природа на калцидиола, логично е да се очакват по-ниски нива на циркулиращ витамин D при по-висок BMI. Това даде основание да разпределим РСa пациентите според BMI в две групи с нормално тегло ($BMI < 25$ kg/m²) и с наднормено тегло или обезитет ($BMI \geq 25$ kg/m²) и да сравним техния витамин D статус.

Средната стойност на BMI за РСa болните (27.53 ± 4.12 kg/m²) не се различава от тази на ДЗП пациентите (26.38 ± 3.17 kg/m²). Тя е с 10% над граничната стойност за BMI 25 kg/m². Разпределението на РСa болните според BMI не показва статистически значими разлики във витамин D статуса между групата с наднормено тегло и обезитет и тази с нормално тегло, съответно 41.20 ± 17.11 nmol/L спрямо 43.44 ± 18.81 nmol/L, $p > 0.05$. Не се установяват статистически значими разлики в зависимост от BMI в бионаличния калцидиол (4.090 ± 1.683 nmol/L спрямо 5.397 ± 3.908 nmol/L, $p > 0.05$) и във VDBP (256.9 ± 140.9 mg/L спрямо 300.7 ± 81.16 mg/L, $p > 0.05$) при болните с рак на простатата.

Витамин D статус и PSA

За да оценим промените във витамин D статуса според тежестта на простатния карцином и риска от костни метастази стратифицирахме болните в две групи съобразно нивата на туморния маркер PSA. Като „cut off“ стойност за риска от костни метастази бе прието ниво на PSA 20 ng/ml (Kamaleshwaran et al, 2012). Резултатите са представени на таблица 11.

Таблица. 11. Средни нива на калцидиол, бионаличен калцидиол и VDBP при болни с простатен карцином според PSA, сравнени с тези на пациентите с доброкачествени заболявания на простатата

Показатели	(1) РСa пациен- ти с PSA<20 ng/ml Хсредно ± SD (n)	(2) РСa пациен- ти с PSA>20 ng/ml Хсредно ± SD (n)	(3) ДЗП пациенти Хсредно ± SD (n)	p
калцидиол (nmol/L)	43.07 ± 15.55 (54)	42.47 ± 23.89 (31)	56.63 ± 21.71 (52)	1vs2 ns 1vs3 p<0.001 2vs3 p<0.05
бионаличен калцидиол (nmol/L)	5.04 ± 3.29 (42)	4.79 ± 3.65 (22)	6.002 ± 2.65 (39)	1vs2 ns 1vs3 ns 2vs3 ns
VDBP (mg/ml)	300.9 ± 79.23 (42)	308.4 ± 82.64 (22)	304.00 ± 82.86 (40)	1vs2 ns 1vs3 ns 2vs3 ns

VDBP- плазмен витамин D свързващ глобулин; PSA-простатно специфичен антиген; ns – статистически незначими разлики, n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при p<0,05. Граничната стойност на PSA за риска от костни метастази е 20 ng/ml (Kamaleshwaran et al, 2012).

Не се откриват статистически значими различия между двете групи РСa пациенти, стратифицирани в зависимост от PSA.

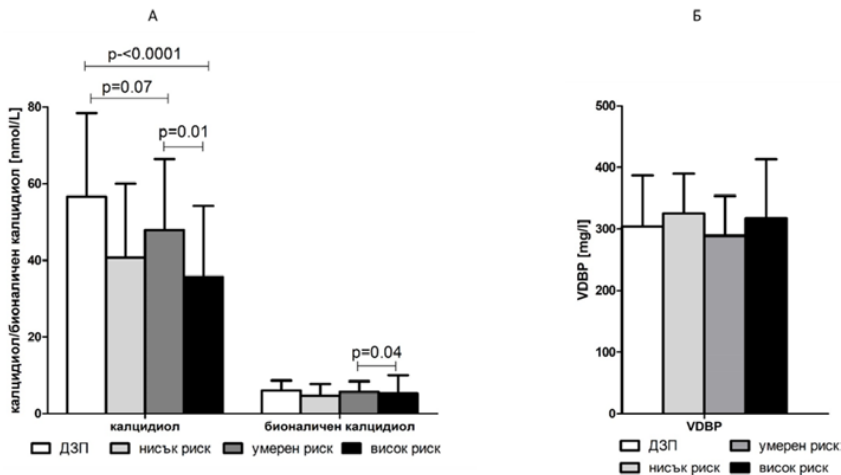
За да оценим възможните промени в PSA в зависимост от витамин D статуса, разпределихме РСa болните в две групи спрямо „cut off“ стойността за серумния калцидиол от 50 nmol/L, гранична за изява на костно разграждане.

Средните нива на PSA за РСa пациентите с нива на калцидиол над 50 nmol/L са 24.34±27.99ng/ml спрямо 33.78±46.82ng/ml за болните с дефицит на витамин D. Наблюдаваното различие не достига до статистическа значимост (p>0,05), но се забелязва тенденция на снижаване на PSA с 38,8% при болните с оптимален и субоптимален витамин D статус спрямо витамин D дефицитната група. Спрямо ДЗП групата, стойностите на PSA при пациентите с простатен карцином остават значимо по-високи, независимо от витамин D статуса им (p<0.0001).

Витамин D статус и риск от биохимичен рецидив (BCR)

За да се оценят промените във витамин D статуса в зависимост от степента на риска от биохимичен рецидив, РСa пациентите са стратифицирани в три групи (с нисък, умерен и с висок риск) като е оценен техният витамин D статус.

Резултатите показват витамин D дефицит и в трите рискови групи, като той е най-силно изразен при пациентите от високорисковата група ($35.69 \pm 18.45 \text{ nmol/L}$) спрямо групата с умерен ($47.87 \pm 18.57 \text{ nmol/L}$) и нисък BCR (40.69 ± 19.32). Статистически значими разлики се откриват в нивата на калцидиола между високорисковата група и тази с умерен BCR ($p < 0.05$). Липсата на статистическа значимост в нивата на калцидиола за групата с нисък BCR спрямо тази с висок риск вероятно се дължи на малкия брой РСa пациенти (7 мъже) в нискорисковата група (фиг. 20А). Подобни са промените и в бионаличния калцидиол, който показва най-високи стойности за групата с умерен BCR ($5.65 \pm 2.78 \text{ nmol/L}$) и по-ниски при пациентите с висок риск ($5.21 \pm 4.78 \text{ nmol/L}$) между които се установява статистическа значимост ($p < 0.05$) (фиг. 20А). Противно на очакванията ни, пациентите от нискорисковата група са с най-нисък бионаличен калцидиол ($4.70 \pm 3.04 \text{ nmol/L}$), вероятно поради малкия размер на извадката (4 болни). За транспортния белтък на витамин D в кръвта, VDBP, не се установяват статистически значими разлики в зависимост от BCR (фиг. 20Б). При сравнението на резултатите за карциномите пациенти с тези за групата пациенти с ДЗП, се установяват значимо по-ниски стойности за калцидиол (за групата с умерен риск $p = 0.07$, а за групата с висок риск – $p < 0.0001$). За бионаличния калцидиол и VDBP не се установяват разлики между болните с ДЗП спрямо отделните рискови групи за пациентите с РСa ($p > 0.05$).



Фиг. 20. Нива на калцидиол, бионаличен калцидиол (А) и VDBP (Б) при пациентите с простатен карцином според риска от биохимичен рецидив, сравнени с нивата на калцидиол, бионаличен калцидиол и VDBP при пациенти с доброкачествени заболявания на простатата.

ДЗП – доброкачествени заболявания на простатата. Стойностите са представени като $\bar{x} \pm SD$. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0,05$.

Витамин D статус и агресивност на туморния процес

Агресивността на простатния карцином е оценявана по скората на Gleason, като са следвани препоръките на Европейското дружество по урология, 2016 година. За да оценим промените във витамин D статуса в зависимост от туморната агресивност, пациентите са разпределени в две групи: със слаба туморна агресивност (скор на Gleason < 7 или скор на Gleason = 7 (3+4)) и със силна агресивност на тумора (скор на Gleason > 7 или скор на Gleason = 7 (4+3)). Резултатите са представени на таблица 12.

Таблица 12. Средни нива на калцидиол, бионаличен калцидиол и VDBP според агресивността на простатния карцином, сравнени с тези на ДЗП пациенти

Показател	(1) РСa пациенти със скор на Gleason<7 Хсредно \pm SD (n)	(2) РСa пациенти със скор на Gleason \geq 7 Хсредно \pm SD (n)	(3) ДЗП пациенти Хсредно \pm SD (n)	p
калцидиол (nmol/L)	46.23 \pm 21.91 (21)	41.74 \pm 17.83 (64)	56.63 \pm 21.71 (52)	1 vs 2 p=0.07 1 vs 3 p=0.06 2 vs 3 p<0.01
бионаличен калцидиол (nmol/L)	5.58 \pm 3.66 (17)	4.34 \pm 2.05 (47)	6.002 \pm 2.65 (39)	1 vs 2 p=0.06 1 vs 3 ns 2 vs 3 p=0.01
VDBP (mg/ml)	312.3 \pm 56.94 (17)	304.8 \pm 76.71 (47)	304.00 \pm 82.86 (40)	1 vs 2 ns 1 vs 3 ns 2 vs 3 ns

VDBP – витамин D свързващ глобулин; ns – статистически незначими разлики, p>0,05; n – брой пациенти.

Резултатите показват тенденция за понижаване на серумния калцидиол и бионаличния калцидиол при РСa пациентите с по-висока агресивност на туморния процес спрямо тези с по-ниско агресивни тумори, с 11% за калцидиола и с 29% за бионаличния калцидиол. Не се установяват промени в нивата на VDBP. Спрямо ДЗП групата показателите, оценяващи витамин D статуса (калцидиол и бионаличен калцидиол) остават значимо по-ниски при пациентите със силно агресивни тумори (съответно, p<0.01 и p=0.01) (таблица 12).

Витамин D статус при орган локализиран и авансирал простатен карцином

За да се изследват промените във витамин D статуса в зависимост от локализацията на туморния процес (локализиран в простатната жлеза – LAD=0 или разпространен извън нея – LAD=1), пациентите са разделени на две групи. Установява се ясна тенденция за влошаване на витамин D статуса на пациентите с авансирал карцином. Стойностите на калцидиола и бионаличния калцидиол са понижени при пациентите с авансирал карцином съответно с 8.8% и 20%, а VDBP е значимо повишен (p=0.05). Спрямо ДЗП групата, стойностите на калцидиол за РСa болните с

локализиран ($p=0.004$) и разпространен извън простатата тумор ($p=0.0004$) са значимо по ниски (Таблица 13).

Таблица 13. Сравнение на средните нива на калцидиол, бионаличен калцидиол и VDBP при болни с локализиран и авансирал простатен карцином, сравнени с тези на ДЗП пациенти

Показател	(1) РСa пациен- ти с LAD=0 Средно \pm SD (n)	(2) РСa пациен- ти с LAD=1 Средно \pm SD (n)	(3) ДЗП пациен- ти Средно \pm SD (n)	p
калцидиол (nmol/L)	44.88 \pm 18.99 (52)	39.66 \pm 18.56 (33)	56.63 \pm 21.71 (52)	1vs2 ns 1vs3 $p=0.004$ 2vs3 $p=0.0004$
бионаличен калцидиол (nmol/L)	5.35 \pm 2.72 (41)	4.44 \pm 4.49 (21)	6.002 \pm 2.65 (39)	1vs2 ns 1vs3 ns 2vs3 $p=0.09$
VDBP (mg/ml)	292.70 \pm 63.29 (42)	324.4 \pm 10.10 (22)	304.00 \pm 82.86 (40)	1vs 2 $p=0.05$ 1vs3 ns 2vs3 ns

VDBP – витамин D свързващ глобулин; LAD=0 – орган локализиран карцином; LAD=1 – авансирал карцином, разпространен извън простатата; ns – статистически незначими разлики, $p>0,05$; n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при $p<0,05$.

Витамин D статус и метастази

Няколко показателя се използват в клиничната практика за оценка на туморното метастазиране: инвазия на туморния процес в семенните мехурчета (SVI), в лимфните възли (LNI) и разпространението му извън простатната жлеза (EPE) (EUA Guideline, 2016). В зависимост от тези три клинични параметъра са оценявани промените във витамин D статуса.

Витамин D статус и инвазия в семенните мехурчета (SVI)

Установява се, макар и статистически незначимо, снижаване (с 11%) в нивата на калцидиола при РСa болните с туморна инвазия в семенните мехурчета спрямо тези без засягане (39.73 \pm 17.02 nmol/L спрямо 43.94 \pm 19.50 nmol/L). Не са установени статистически значими разлики в нивата на бионаличния калцидиол (4.997 \pm 2.781 nmol/L спрямо 5.240 \pm 5.673 nmol/L) и VDBP (303.8 \pm 66.68 mg/ml спрямо 302.9 \pm 126.3 mg/ml). Спрямо ДЗП групата нивата на калцидиол са значимо по-ниски както при пациентите без засягане на семенните мехурчета ($p<0.01$), така

и при болните с инвазия в семенните мехурчета ($p < 0.001$). Различията в нивата на бионаличния калцидиол за горепосочените групи са на границата на значимост ($p = 0.08$). За VDBP не се откриват промени.

Витамин D статус и инвазия в лимфните възли (LNI)

Не се установяват промени във витамин D статуса на болните без и със метастази в лимфните възли (43.29 ± 18.92 nmol/L спрямо 40.43 ± 19.28 nmol/L). Бионаличният калцидиол е с 36% по-нисък при пациентите с метастази, но разликите не са статистически значими (3.805 ± 2.613 nmol/L спрямо 5.173 ± 3.477 nmol/L, $p > 0.05$). За VDBP също не се установяват статистически значими различия, но има тенденция на повишение в нивата му при пациентите с метастази в лимфните възли спрямо групата без метастази (337.0 ± 104.4 mg/ml спрямо 300.1 ± 77.26 mg/ml). Спрямо ДЗП групата нивата на калцидиола са значимо по-ниски и при двете групи РСa пациенти без метастази ($p < 0.05$) и с метастази ($p < 0.001$). Нивата на бионаличния калцидиол са статистически значимо намалени за РСa болните с метастази ($p < 0.05$) спрямо ДЗП групата. За VDBP не се откриват подобни различия.

Витамин D статус и екстрапростатно разпространение на тумора (EPE)

Стратифицирането според отсъствието или наличието на екстрапростатно разпространение на тумора показва снижаване на калцидиола (45.12 ± 18.67 nmol/L спрямо 38.90 ± 18.91 nmol/L, $p = 0.07$) и на бионаличния калцидиол (5.308 ± 2.69 nmol/L спрямо 4.478 ± 4.02 nmol/L, $p = 0.006$). Стойностите на VDBP слабо се покачват при болните с екстрапростатна екстензия (295.8 ± 65.80 mg/ml спрямо 319.5 ± 103.10 mg/ml, $p > 0.05$), но разликата остава статистически незначима. Спрямо ДЗП групата нивата на калцидиола са значимо по-ниски и при двете групи РСa пациенти без екстрапростатна екстензия ($p < 0.01$) и с разпространение на тумора извън простатата ($p < 0.0001$). Различията в нивата на бионаличния калцидиол спрямо ДЗП пациентите са на границата на статистическата значимост само за групата с екстрапростатна екстензия ($p = 0.08$). За VDBP не се откриват промени.

Корелативни зависимости между калцидиол и утвърдени клинични биохимични маркери

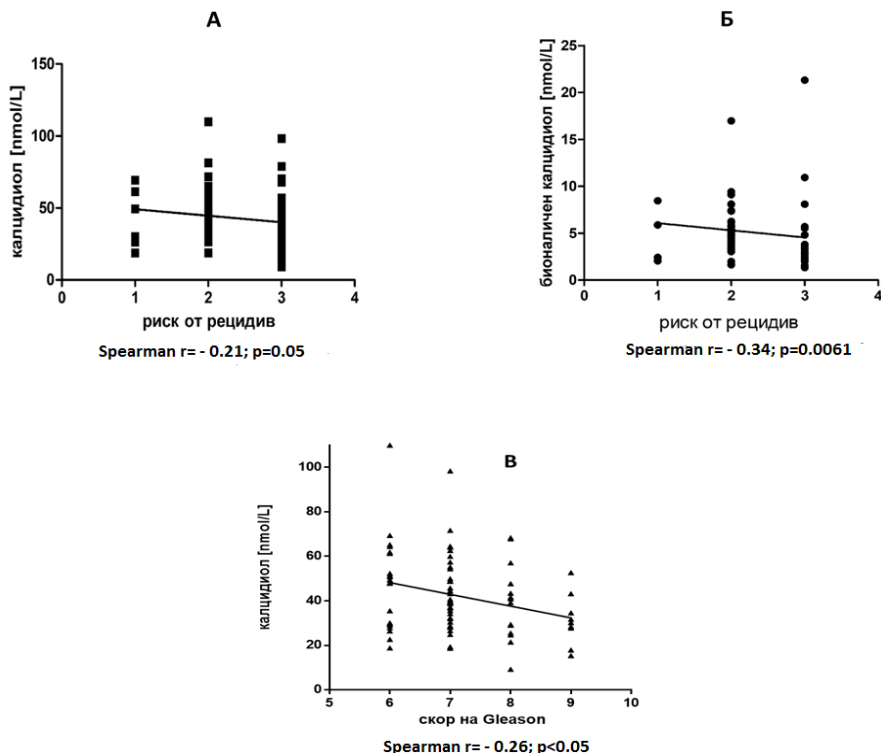
Проведените корелационни анализи целят да се потърси потенциална причинно-следствена връзка между показателите, оценяващи витамин D статуса и утвърдените в клиничната практика патоморфологични и биохимични параметри за оценка на простатния карцином. На таблица 14 са представени в обобщен вид резултатите от проведените корелационни анализи.

Таблица 14. Корелативни връзки между изследваните показатели за оценка на витамин D статуса с утвърдени в клиничната практика патоморфологични и биохимични параметри за хода на простатния карцином

Показател	Клинични показатели		
	PSA	BCR	скор на Gleason
калцидиол (nmol/L)	$r = -0.03$; ns	$r = -0.21$; $p=0.05$	$r = -0.26$; $p<0.05$
бионаличен калцидиол (nmol/L)	$r = -0.11$; ns	$r = -0.34$; $p=0.006$	$r = -0.18$; ns
VDBP (mg/ml)	$r = 0.06$; ns	$r = 0.13$; ns	$r = 0.00$; ns

VDBP - витамин D свързващ глобулин; PSA - простатно-специфичен антиген; BCR - риск от биохимичен рецидив; ns – липса на статистическа значимост, $p>0.05$. Използван е непараметричен корелационен анализ на Spearman, ниво на статистическа значимост $p<0.05$.

Корелационни зависимости са установени между риска от биохимичен рецидив, калцидиол (фиг. 21А) и бионаличен калцидиол (фиг. 21Б) и между скор на Gleason и калцидиол (фиг. 21В).

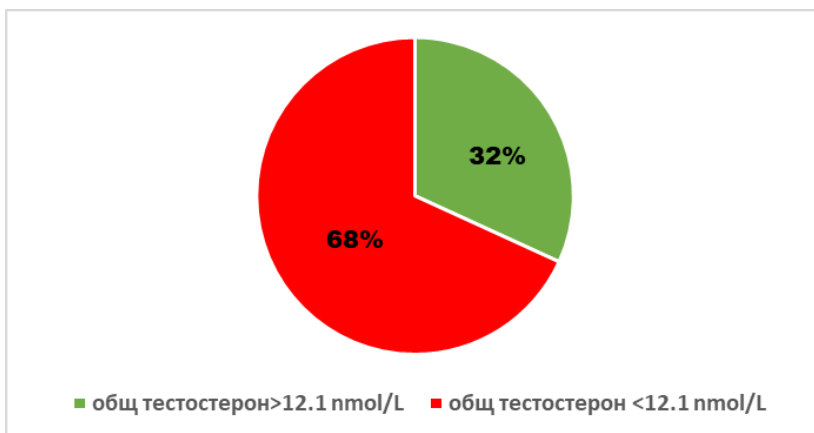


Фиг. 21. Корелативни зависимости между калцидиол, бионаличен калцидиол и утвърдени клинични параметри за хода на заболяването при пациенти с простатен карцином.

калцидиол и риск от биохимичен рецидив (А); бионаличен калцидиол и риск от биохимичен рецидив (Б); калцидиол и скор на Gleason (В). Използван е непараметричен корелационен анализ на Spearman, ниво на статистическа значимост $p<0,05$.

Оценка на андрогенния статус на пациентите с простатен карцином

Биохимичната оценка на андрогенния статус се базира на серумните нива на тестостерона (Laurent et al, 2016), тъй като той и неговата по-активна форма, дихидротестостерон, се свързват най-здраво с AR в сравнение с останалите циркулиращи андрогени. Разпределението на пациентите с простатен карцином според нивата на общия тестостерон спрямо „cut off“ стойността 12.1 nmol/L е представено на фигура 22.



Фиг. 22. Процентно разпределение на пациентите с простатен карцином според нивата на общия серумен тестостерон.

Приета е „cut off“ стойност за общ серумен тестостерон 12.1 nmol/L (Lunenfeld et al, 2015)

От всички изследвани 88 РСa пациента, 60 са с нива на общ тестостерон под 12.1 nmol/L. В сравнение с ДЗП болните процентът на РСa пациентите с нива на тестостерон под 12.1 nmol/L е по-висок (съответно, 44% спрямо 68%).

За оценка на андрогения статус на РСa пациентите освен нивата на общ и свободен тестостерон, основни андрогени, определящи андрогения статус, са изследвани и нивата на техните прекурсори андростендион и DHEAs и серумните нива на SHBG, транспортен белтък за полови хормони. Определени са и съотношенията свободен/общ тестостерон и свободния андрогенен индекс (общ тестостерон/SHBG) като по-прецизни показатели за оценка нивата на биоактивния тестостерон. Поради липсата на специфичност на PSA, е определено съотношението PSA/общ тестостерон, препоръчвано в литературата от последните години като допълнителен индикатор за оценка на риска от рак на простатата като (García-Cruz et al, 2013). Резултатите са представени на таблица 15.

Таблица 15. Средни нива на андрогени и андрогенни индекси при пациенти с простатен карцином, сравнени с нивата на съответните андрогени при болни с доброкачествени заболявания на простатата

Показатели	РСа пациенти Хсредно ± SD (n)	ДЗП пациенти Хсредно ± SD (n)	Р
общ тестостерон (nmol/L)	10.51 ± 4.25 (87)	12.80 ± 4.57 (54)	0.003
свободен тестостерон (pmol/L)	26.98 ± 10.48 (87)	32.08 ± 10.03 (54)	0.004
андростендион (nmol/L)	5.52 ± 2.550 (88)	5.92 ± 2.70 (54)	ns
DHEAs (μmol/L)	2.74 ± 1.20 (88)	2.31 ± 0.93 (54)	0.02
SHBG (nmol/L)	73.24 ± 44.83 (74)	72.32 ± 32.85 (39)	ns
свободен андрогенен индекс (%)	19.10 ± 12.43 (73)	20.37 ± 14.94 (39)	ns
процент свободен тестостерон (%)	0.28 ± 0.21 (87)	0.25 ± 0.04 (54)	ns
PSA/общ тестостерон	15.21 ± 28.22 (87)	1.76 ± 2.17 (52)	<0.0001

ДЗП-доброкачествени заболявания на простатата; DHEAs- дехидроепиандростерон сулфат; SHBG- серумен глобулин, свързващ полови хормони; свободен андрогенен индекс(общ тестостерон/SHBG x 100); ns – липса на статистическа значимост, p>0,05; n – брой пациенти. Статистическа знаимост е отчитана при p<0,05.

Резултатите показват статистически значимо понижение в общия (с 34%) и свободния тестостерон (с 19%) при РСа пациентите спрямо ДПЗ болните (p<0,01). Нивата на андрогенния прекурсор DHEAs са повишени с 19% при РСа групата (p<0,05). Останалите андрогени не показват статистически значими промени спрямо ДЗП групата. Средната стойност на общия тестостерон за болните от простатен карцином е с 15% под „cut off“ стойността 12.1 nmol/L.

Влияние на сезона върху андрогенния статус

Сезонните промени в тестостерона отдавна са обект на дискусии в литературата. Данните за наличие на такава сезонна зависимост са разнопосочни и противоречиви. В редица моделни системи е установено,

че витамин D повлиява продукцията на тестостерон. Освен това, неговите серумни нива имат изразени сезонни вариации. Всичко това обоснова изследването на сезонни вариации и при андрогените. Пациентите са разпределени в две групи според периода на вземане на кръвта за изследване на андрогени: „топъл сезон“, обхващащ месеците от юни до октомври; „студен“ сезон – месеците от ноември до май.

Резултатите за средната стойност на общия тестостерон за „топъл“ и „студен“ сезон са съответно 9.99 ± 3.86 nmol/L и 10.88 ± 4.92 nmol/L, а за свободния тестостерон 27.22 ± 9.709 nmol/L и 26.05 ± 12.02 nmol/L. Не се установява сезонна вариация в нивата на общия и свободния тестостерон. Не се установяват сезонни промени и за останалите изследвани андрогени.

Влияние на индекса телесна маса (BMI) върху андрогенния статус

Не се установяват статистически значими разлики между средните нива на андрогените за двете групи болни с простатен карцином според индекса телесна маса, но се наблюдават значимо по-ниски нива на общ, свободен тестостерон и процента свободен тестостерон при групата РСa болни с наднормено тегло спрямо ДЗП пациентите (таблица 16).

Таблица 16. Средни стойности на андрогени при пациенти с нормално и наднормено тегло според индекса телесна маса, сравнени с нивата на съответните андрогени при болни с доброкачествени заболявания на простатата

Показатели	(1) РСa пациенти с BMI<25 X _{средно} ± SD (n)	(2) РСa пациенти с BMI≥25 X _{средно} ± SD (n)	(3) ДЗП пациенти X _{средно} ± SD (n)	p
общ тестостерон (nmol/L)	11.10±4.895 (25)	10.14±4.18 (62)	12.80 ± 4.57 (54)	1vs2 ns 1vs3 ns 2vs3 p=0.01
свободен тестостерон (pmol/L)	27.19±11.44 (25)	26.51±10.67 (62)	32.08 ± 10.03 (54)	1vs2 ns 1vs3 p=0.05 2vs3 p=0.004
андростендион (nmol/L)	5.544±2.707 (25)	5.497±2.526 (62)	5.92 ± 2.70 (54)	ns
DHEAs (μmol/L)	2.868±1.132 (25)	2.726±1.208 (62)	2.31 ± 0.93 (54)	ns
SHBG (nmol/L)	107.6±56.52 (20)	60.93±31.84 (53)	72.32 ± 32.85 (39)	1vs2 p<0.0001 1vs3 p=0.003 2vs3 p=0.09
PSA/ общ тестостерон	13.27±24.87 (25)	14.38±28.03 (33)	1.76±2.17 (52)	1vs2 ns 1vs3 p<0.0001 2vs3 p<0.0001
свободен андрогенен индекс (%)	15.12±10.30 (25)	20.39±13.12 (53)	20.37±14.94 (39)	1vs2 p=0.08 1vs3 ns
процент свободен тестостерон (%)	0.25±0.01 (25)	0.32±0.06 (62)	0.2597±0.048 (54)	1vs2 ns 1vs3 ns 2vs3 p<0.0001

ДЗП – доброкачествени заболявания на простатата; DHEAs- дехидроепиандростерон сулфат; SHBG- серумен глобулин, свързващ полови хормони; свободен андрогенен индекс = общ тестостерон/SHBG x 100); ns – липса на статистическа значимост, p>0.05; n – брой пациенти; BMI < 25 – пациенти с нормално тегло; BMI ≥ 25 – пациенти с наднормено тегло/обезитет. Статистическа значимост е отчитана при p<0,05.

Андрогенен статус и PSA

За да се оценят промените в нивата на изследваните андрогени в зависимост от тежестта на простатния карцином, РСa болните са стратифицирани в две групи според нивата на PSA под и над 20 ng/ml, рискова стойност за костни метастази (Kamaleshwaran et al, 2012). Статистически значими разлики между двете групи РСa пациенти са установени за показателя PSA/общ тестостерон, оценяващ риска от простатен карцином. Той е 9.5 пъти повишен при групата с PSA над 20

ng/ml. Установява се повишение в андростендиона (с 21%) при групата с повишен риск от костни метастази ($p=0.05$). Не се откриват статистически значими различия в изследваните андрогени спрямо съответстващите им стойности за ДЗП болните (таблица 17).

Таблица 17. Средни нива на андрогени според PSA при болни с простатен карцином, сравнени с нивата на съответните андрогени при болни с доброкачествени заболявания на простатата

Показатели	(1) РСa пациенти с PSA<20ng/ml $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	(2) РСa пациенти с PSA \geq 20ng/ml $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	(3) ДЗП пациенти $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	p
общ тестостерон (nmol/L)	10.80 \pm 3.88 (54)	10.04 \pm 4.83 (33)	12.80 \pm 4.57 (54)	1vs2, ns 1vs3, ns 2vs3, ns
свободен тестостерон (pmol/L)	27.43 \pm 9.23 (54)	26.24 \pm 12.38(33)	32.08 \pm 10.03 (54)	1vs2, ns 1vs3, ns 2vs3, ns
андростендион (nmol/L)	5.11 \pm 2.15 (55)	6.19 \pm 3.01 (33)	5.92 \pm 2.70 (54)	1vs2 $p=0.05$ 1vs3, ns 2vs3, ns
DHEAs (μ mol/L)	2.78 \pm 1.21 (55)	2.65 \pm 1.20 (33)	2.31 \pm 0.93 (54)	1vs2, ns 1vs3, ns 2vs3, ns
SHBG (nmol/L)	74.88 \pm 47.98(47)	70.39 \pm 39.43 (27)	72.32 \pm 32.85 (39)	1vs2, ns 1vs3, ns 2vs3, ns
PSA/ общ тестостерон	3.58 \pm 2.16 (54)	34.23 \pm 39.14(33)	1.76 \pm 2.17 (52)	1vs2 $p<0.05$ 2vs3 $p<0.0001$ 1vs3 ns
свободен андрогенен индекс (%)	18.71 \pm 11.00 (46)	19.76 \pm 14.76 (27)	20.37 \pm 14.94 (39)	1vs2, ns 1vs3, ns 2vs3, ns
процент свободен тестостерон (%)	0.2617 \pm 0.062 (54)	0.3251 \pm 0.3375 (33)	0.2597 \pm 0.048 (54)	1vs2, ns 1vs3, ns 2vs3, ns

DHEAs- дехидроепиандростерон сулфат; SHBG- белтък свързващ половите хормони; PSA- простатно специфичен антиген; свободен андрогенен индекс, изчислен като общ тестостерон/SHBG; ns – статистически незначими разлики, $p>0.05$; n – брой пациенти. Гранична стойност на PSA за риска от костни метастази е 20 ng/ml (Kamaleshwaran et al, 2012). Статистическа значимост е отчитана при $p<0,05$.

За да се оцени влиянието на андрогенния статус върху нивата на PSA, болните бяха разделени на две групи според „cut off“ стойността 12.1

nmol/L за общия тестостерон. Установи се ясна тенденция за повишаване на PSA с 41% при пациентите с тестостерон под 12.1 nmol/L спрямо болните с нива на тестостерон над тази стойност (34.51 ± 47.54 ng/ml спрямо 24.35 ± 28.17 ng/ml) (таблица 17).

Андрогенен статус и риск от биохимичен рецидив (BCR)

За да се оценят промените в нивата на изследваните андрогени в зависимост от риска от биохимичен рецидив, пациентите са разделени на 3 рискови групи в зависимост от BCR: с нисък, умерен и висок риск. Оценката на риска и стратифицирането на РСa пациентите са извършени според препоръките на Европейското дружество по урология, 2016г.

Установена е ясна тенденция на понижаване на общия тестостерон с нарастване на риска, съответно с 28% при групите с нисък спрямо умерен риск и с 15% при групите с нисък спрямо висок риск. Същата тенденция се наблюдава и при свободния тестостерон, който се понижава съответно с 16% и 7%. Стойностите на тези два показателя остават по-ниски за всички рискови групи спрямо нивата им за ДЗП болните. Статистически значимо увеличение се наблюдава в стойностите на SHBG и PSA/общ тестостерон с нарастване на BCR (таблица 18).

Таблица 18. Средни нива на андрогени и андрогенни индекси според риска от биохимичен рецидив при пациенти с простатен карцином, сравнени с нивата на съответните андрогени при болни с доброкачествени заболявания на простатата

Показатели	(1) PCa пациенти с нисък риск $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	(2) PCa пациенти с умерен риск $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	(3) PCa пациенти с висок риск $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	(4) ДЗП пациенти $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	p
общ тестостерон (nmol/L)	12.44±4.98 (8)	9.68±3.55 (36)	10.85±4.58 (43)	12.80 ± 4.57 (54)	1 vs2 p=0.07
свободен тестостерон (pmol/L)	29.63±12.30 (8)	25.47±8.78 (36)	27.75±11.47 (43)	32.08 ± 10.03 (54)	ns
Андростендион (nmol/L)	5.11±1.99 (8)	5.27±2.36 (37)	5.81±2.81 (43)	5.92 ± 2.70 (54)	ns
DHEAs (μmol/L)	2.33±0.94 (8)	2.72±1.24 (37)	2.83±1.23 (43)	2.31 ± 0.93 (54)	ns
SHBG (nmol/L)	64.7±25.53 (6)	61.36±36.70 (31)	79.68±41.91 (36)	72.32 ± 32.85 (39)	2vs3 p<0.01
PSA/ общ тестостерон	3.25±1.75 (8)	6.634±7.037 (35)	22.83±36.50 (43)	1.76±2.17 (52)	1 vs2 ns 1 vs3 p<0.05 1 vs4 p=0.06 2 vs3 p<0.01 2 vs4 p<0.0001 3 vs4 p<0.0001
свободен андрогенен индекс (%)	20.09±6.98 (6)	20.99±12.72 (31)	17.30±12.87 (36)	20.37±14.94 (39)	ns
процент свободен тестостерон (%)	0.24± 0.05 (8)	0.36±0.61 (37)	0.30±0.29 (43)	0.25±0.04 (54)	ns

DHEAs- дехидроепиандростерон сулфат; SHBG- белтък свързващ половите хормони; PSA- простатно специфичен антиген; Свободният андрогенен индекс е изчислен като общ тестостерон/SHBG, ns – липса на статистическа значимост, p>0,05; n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при p<0,05.

Андрогенен статус и агресивност на простатния карцином

Агресивността на простатния карцином е оценявана по скор на Gleason, като са следвани препоръките на Европейското дружество по урология, 2016 година. За да оценим промените в андрогенния статус в зависимост от туморната агресивност, пациентите са разпределени в две групи: с ниска туморна агресивност (скор на Gleason < 7 или скор на Gleason = 7 (3+4)) и с висока агресивност на тумора (скор на Gleason > 7 или скор на Gleason = 7 (4+3)). Резултатите са представени на таблица 19.

Установява се тенденция за понижаване в нивата на тестостерона с агресивността на туморния процес ($p=0.08$). Пациентите с по-агресивни тумори показват значимо по-ниски нива на общия серумен тестостерон спрямо ДЗП групата ($p<0,05$). Индексът PSA/общ тестостерон статистически значимо се повишава с нарастване на туморната агресивност ($p<0.01$) и остава значимо по-висок за двете РСa групи спрямо ДЗП болните (съответно $p<0,05$ и $p<0.01$).

Таблица 19. Средни нива на андрогени и андрогенни индекси според агресивността на простатния карцином, сравнени с нивата на съответните андрогени при болни с доброкачествени заболявания на простатата

Показатели	(1) РСa пациенти със скор на Gleason<7 $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	(2) РСa пациенти със скор на Gleason \geq 7 $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	(3) ДЗП пациенти $\bar{x}_{\text{средно}} \pm \text{SD (n)}$	p
общ тестостерон (nmol/L)	11.37 \pm 3.82 (21)	10.27 \pm 4.42 (66)	12.80 \pm 4.57 (54)	1vs2 p=0.08 2vs3 p<0.05
свободен тестостерон (pmol/L)	28.67 \pm 10.65 (21)	26.44 \pm 10.45 (66)	32.08 \pm 10.03 (54)	ns
андростендион (mg/ml)	4.68 \pm 2.02 (22)	5.80 \pm 2.66 (66)	5.92 \pm 2.70 (54)	ns
DHEAs (μ mol/L)	2.49 \pm 1.04 (22)	2.82 \pm 1.26 (66)	2.31 \pm 0.93 (54)	ns
SHBG (nmol/L)	74.45 \pm 54.33 (18)	72.85 \pm 41.88 (56)	72.32 \pm 32.85 (39)	ns
PSA/ общ тестостерон	5.04 \pm 4.80 (21)	18.44 \pm 31.66 (66)	1.76 \pm 2.17 (52)	1 vs 2 p<0.01 1 vs 3 p<0.05 2 vs 3 p<0.01
свободен андрогенен индекс (%)	20.92 \pm 9.29 (16)	18.58 \pm 13.21 (57)	20.37 \pm 14.94 (39)	ns
процент свободен тестостерон (%)	0.25 \pm 0.06 (21)	0.29 \pm 0.24 (66)	0.25 \pm 0.04 (54)	ns

DHEAs- дехидроепиандростерон сулфат; SHBG- белтък свързващ половите хормони; PSA- простатно специфичен антиген; свободен андрогенен индекс, изчислен като общ тестостерон/SHBG; ns – статистически незначими разлики, p>0,05; n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при p<0,05.

Андрогенен статус при локализиран и авансирал простатен карцином

За да се изследват промените в андрогенния статус в зависимост от локализацията на тумора (локализиран в простатната жлеза – LAD=0 или разпространен извън нея – LAD=1), пациентите са разделени на две групи.

Установява се добре изразена тенденция на повишаване в нивата на общия и свободния тестостерон при пациентите с авансирал карцином на простатата спрямо тези с локализиран. Спрямо ДЗП болните тези два показателя остават значимо по-ниски (таблица 20).

Таблица 20. Сравнение в средните нива на андрогени и андрогенни индекси при болни с локализиран и авансирал простатен карцином и със съответните стойности при ДЗП пациенти.

Показател	(1)PCa пациенти с LAD=0 Хсредно \pm SD (n)	(2) PCa пациенти с LAD=1 Хсредно \pm SD (n)	(3) ДЗП пациенти Хсредно \pm SD (n)	p
тестостерон (nmol/L)	9.80 \pm 4.27 (54)	11.34 \pm 4.42 (34)	12.80 \pm 4.57 (54)	1vs3 p=0.0006 1vs2 ns 2vs3 ns
свободен тестостерон (pmol/L)	25.27 \pm 10.33 (54)	28.94 \pm 11.23 (34)	32.08 \pm 10.03 (54)	1vs3 p<0.0007 1vs2 ns 2vs3 ns
андростендион (mg/ml)	5.59 \pm 2.64 (54)	5.40 \pm 2.42 (34)	5.92 \pm 2.70 (54)	ns
DHEAs (μ mol/L)	2.74 \pm 1.28 (54)	2.73 \pm 1.09 (34)	2.31 \pm 0.93 (54)	ns
SHBG (nmol/L)	62.02 \pm 33.83 (44)	83.79 \pm 43.69 (29)	72.32 \pm 32.85 (39)	1vs2 p=0.01 1vs3 ns 2vs3 ns
PSA/ общ тестостерон	10.99 \pm 24.83 (44)	21.78 \pm 32.11 (34)	1.76 \pm 2.17 (52)	1vs2 p=0.08 1vs3 p<0.0001 2vs3 p<0.0001
свободен андрогенен индекс (%)	20.09 \pm 12.11 (44)	17.59 \pm 12.98 (29)	20.37 \pm 14.94 (39)	ns
процент свободен тестостерон (%)	0.33 \pm 0.51 (54)	0.32 \pm 0.33 (34)	0.25 \pm 0.04 (54)	ns

DHEAs- дехидроепиандростерон сулфат; SHBG- белтък свързващ половите хормони; PSA- простатно специфичен антиген; свободен андрогенен индекс, изчислен като общ тестостерон/SHBG; LAD=0 – орган локализиран карцином; LAD=1 – авансирал карцином; ns – липса на статистическа значимост, p>0,05; n – брой пациенти. Статистическа значимост е отчитана при <0.05.

Андрогенен статус и метастази

За да се оценят промените в андрогенния статус в зависимост от степента на туморно метастазиране са сравнени нивата на изследваните андрогените и андрогенни инделси в зависимост от следните клинични параметри: инвазия на туморния процес в семенните мехурчета (SVI), в лимфните възли (LNI) и разпространението му извън простатната жлеза (EPE) (EUA Guideline, 2016).

Андрогенен статус и инвазия в семенните мехурчета (SVI)

Установява се статистически значимо снижаване (с 21%) в нивата на процента свободен тестостерон при РСa болните с туморна инвазия в семенните мехурчета спрямо тези без засягане (0.24 ± 0.07 спрямо 0.29 ± 0.24 , $p < 0.05$). Не са установени статистически значими разлики в нивата на останалите андрогени. Спрямо ДЗП групата нивата на общия и свободен тестостерон са значимо по-ниски както при пациентите без засягане на семенните мехурчета ($p < 0.01$), така и при болните с инвазия в семенните мехурчета ($p < 0.05$). Логично е стойностите на индекса PSA/общ тестостерон да бъдат значимо повишени при двете групи РСa болни в сравнение с нивата на този показател при ДЗП пациентите поради силно повишените стойности на PSA, дължащи се на усилено протичащи деструктивни процеси в простатната жлеза при раковоболните пациенти.

Андрогенен статус и инвазия в лимфните възли (LNI)

Не се установяват промени в изследваните андрогени между двете групи болни без и със метастази в лимфните възли. Наблюдава се слабо изразена тенденция на намаляване в нивата на общ и свободен тестостерон при пациентите със засягане на лимфните възли: за общия тестостерон - 10.60 ± 4.35 pmol/L спрямо 9.21 ± 4.45 pmol/L; за свободния тестостерон - 26.88 ± 10.41 pmol/L спрямо 25.58 ± 13.11 pmol/L. Спрямо ДЗП групата нивата на общия и свободния тестостерон са значимо по-ниски и при двете групи РСa пациенти без метастази ($p < 0.01$) и с метастази ($p < 0.05$). При останалите андрогени не се откриват значими промени.

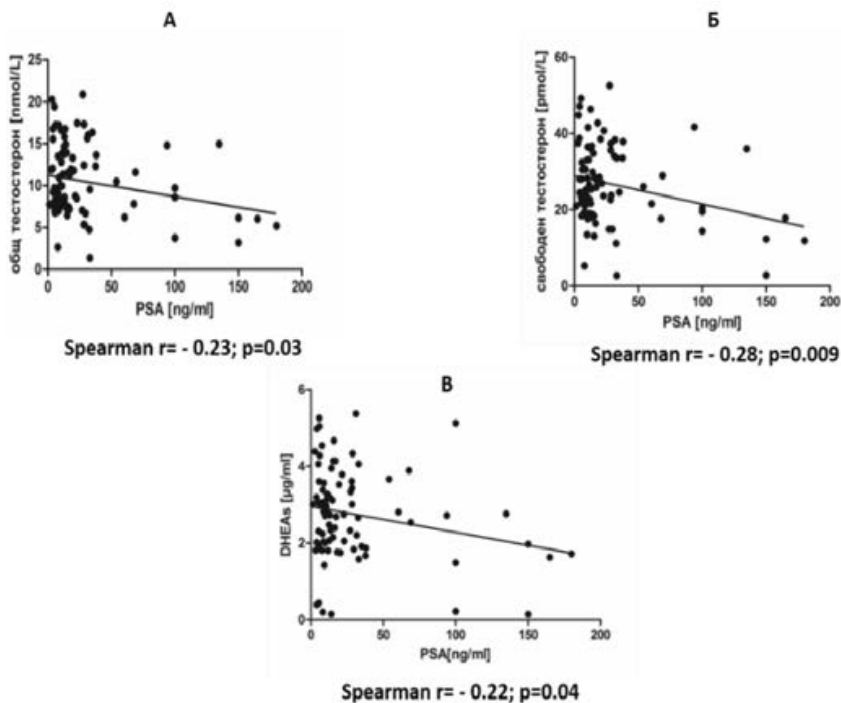
Андрогенен статус и екстрапростатно разпространение на тумора (EPE)

При пациентите с екстрапростатно разпространение на тумора се установява ясна тенденция за повишаване на общия тестостерон (11.24 ± 4.48 nmol/L спрямо 9.91 ± 4.27 nmol/L), на свободния тестостерон (28.59 ± 11.49 pmol/L спрямо 25.60 ± 10.29 pmol/L), на процента свободен тестостерон (0.32 ± 0.34 спрямо 0.26 ± 0.06) и на SHBG (83.61 ± 43.01 nmol/L спрямо 67.28 ± 45.21 nmol/L) в сравнение с болните без метастази.

Корелативни зависимости между отделните андрогени и клинични и биохимични параметри, отразяващи хода на заболяването

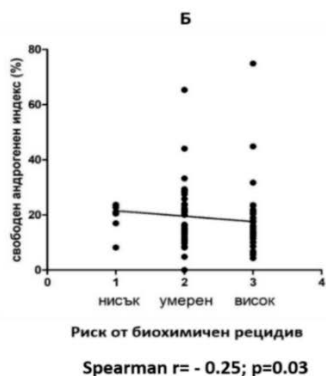
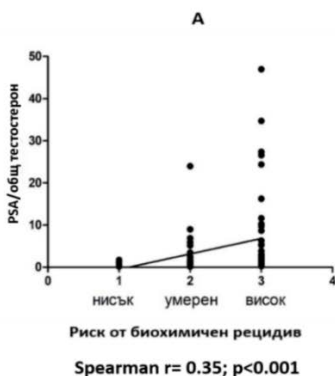
Проведените корелационни анализи са целяха да се изследват потенциални причинно-следствени връзки между показателите, оценяващи андрогенния статус и утвърдените в клиничната практика патоморфологични и биохимични показатели за оценка на простатния карцином.

Изследването на причинно следствени връзки между *туморния маркер PSA* и андрогени установи слаби, но статистически значими негативни корелативни зависимости с общия тестостерон, свободния тестостерон и DHEAs при РСa пациентите (фиг. 23).



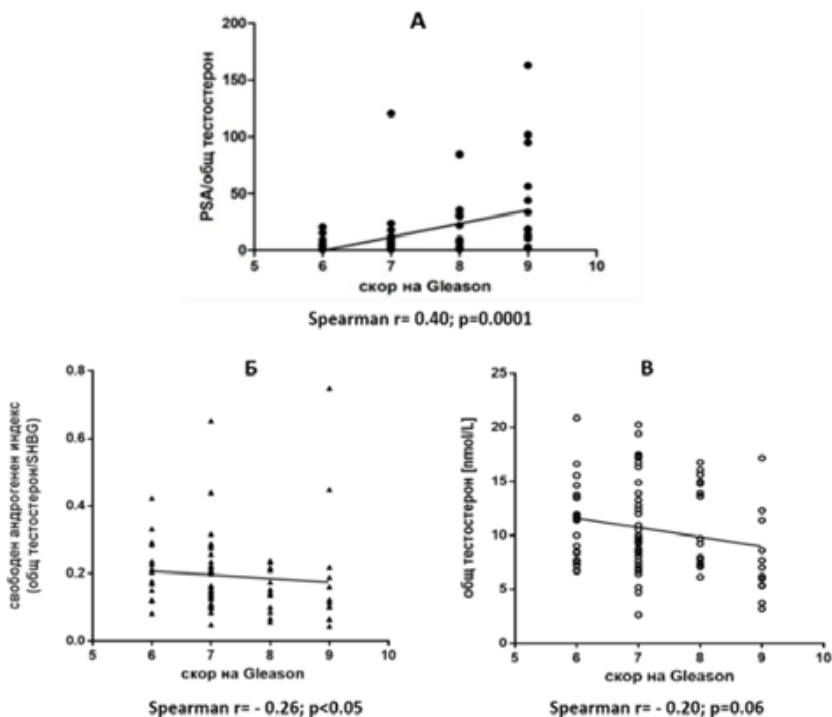
Фиг. 23. Корелативни зависимости между PSA и общ тестостерон (А), между PSA и свободен тестостерон (Б) и между PSA и DHEAs (В).
Използван е непараметричен корелационен анализ на Spearman, ниво на статистическа значимост $p < 0.05$.

Статистически значима позитивна корелативна зависимост е открита между *риска от биохимичен рецидив* и показателят PSA/общ тестостерон (фиг. 24А). Значима негативна причинно следствена взаимовръзка е установена със свободния андрогенен индекс (фиг. 24Б).



Фиг. 24. Корелационни зависимости между риска от биохимичен рецидив и съотношението PSA/общ тестостерон (А) и свободния андрогенен индекс (Б). Използван е непараметричен корелационен анализ на Spearman, ниво на статистическа значимост $p < 0,05$. Рискът от биохимичен рецидив е определян според EUA Guideline, 2016.

Търсенето на корелативни връзки с *агресивността на туморния процес*, оценявана по скората на Gleason показва умерена по сила статистически значима позитивна корелация между скората на Gleason и показателят PSA/общ тестостерон (фиг. 25А). Негативни корелативни зависимости са открити със свободния андрогенен индекс (фиг. 25Б) и с общия тестостерон (фиг. 25В).



Фиг. 25. Корелационни зависимости между скоря на Gleason и съотношението PSA/общ тестостерон (А), свободния андрогенен индекс (Б) и общия тестостерон (В). Използван е непараметричен корелационен анализ на Spearman, ниво на статистическа значимост $p < 0,05$.

Обсъждане на резултатите

Витамин D статус

Редица изследвания в *in vitro* и *in vivo* модели потвърждават хипотезата, че калцитриол и други агонисти на VDR индуцират забавянето на растежа, програмираната клетъчна смърт и/или спомагат диференциацията на ракови клетки. Установено е, че простатните неопластични клетки експресират както рецептора за витамин D, така и ензимите, участващи в метаболизма му (Deeb et al, 2011; Marshall et al, 2012). В експериментални модели с клетъчни култури от простатни ракови клетки е установено, че добавянето на калцитриол инхибира растежа им (Zhao et al, 2000).

Докато в експериментални модели с клетъчни култури и опитни животни се установява по един категоричен начин противотуморния ефект на витамин D, не така категорично са потвърдени тези ефекти на витамин D по отношение на превенцията, възникването и/или прогресията на простатния карцином при хора. Интензивните проучвания в тази област предоставят все още твърде дискутабилни резултати.

В настоящото проучване витамин D статусът на болните с простатен карцином е значително влошен спрямо този на пациентите с доброкачествени заболявания на простатата. Нивата на циркулиращия калцидиол, основен маркер, оценяващ витамин D статуса (Holick et al, 2011), са в областта на витамин D дефицит под 50 nmol/L, с 32% по-ниски от тези на пациентите с бенигнни заболявания. От болните с простатен карцином 70% са с дефицит на витамин D, докато този процент при ДЗП групата е 43%.

Съпоставими с нашите резултати са данните от епидемиологични проучвания, установяващи дефицит и различна по степен недостатъчност на витамин D със стойности на калцидиол под 50nmol/L. Изследване от последните години върху витамин D статуса на 120 болни с простатен карцином и 120 здрави пациенти от Индия на възраст над 50 години, установява тежко изразен витамин D дефицит, характеризиращ се с двукратно по-ниски средни стойности на серумния калцидиол при мъжете с простатен карцином спрямо контролна група здрави мъже (29.25 ± 2.65 nmol/L спрямо 60.75 ± 3.85 nmol/L) (Kambale et al, 2016).

Авторите съобщават за витамин D дефицит при 66.7% от РСa болните като само 10% от тях са с оптимален витамин D статус (серумен калцидиол над 75 nmol/L), резултати близки до получените в настоящото проучване, съответно 70% и 5%. В потвърждение на данните от настоящото проучване са и резултатите от предходно наше пилотно изследване върху витамин D статуса на български пациенти с простатен карцином и доброкачествена простатна хиперплазия, доказващи дефицитен витамин D статус при РСa групата (Galunska et al, 2015).

В литературата се срещат и изследвания, които не доказват статистически значими различия по отношение на витамин D статуса между пациенти с простатен карцином и съответните им здрави контроли или болни с бенигнени заболявания на простатата (Faupel-Badger et al, 2007; Trump et al, 2009, Yaturu et al, 2012). Възможно обяснение за тази разнородност на резултатите е, че понякога се сравняват данни без да се съобразяват сезонните вариации или възрастовите и расови различия между пациентите (Trump et al, 2009). Проучване от последните години върху 383 мъже с простатен карцином на възраст 40-79 години с различна расова принадлежност и контролна група мъже на същата възраст без злокачествено заболяване не намира промени във витамин D статуса между двете групи (52.5 nmol/L спрямо 55 nmol/L) (Murphy et al, 2014). Авторите съобщават по-нисък дял на РСa пациентите с витамин D дефицит (42%) в сравнение с нашите резултати (70%), докато данните за случаите с тежък витамин D дефицит (15.7%) са близки до установените в нашето проучване (14%). Други автори не установяват разлики в нивата на калцидиол при болни с простатен карцином и контролна група (71 nmol/L спрямо 71.5 nmol/L) (Yaturu et al, 2012). Нещо повече, съобщаваните стойности са сравнително високи и попадат в областта на леко степенна витамин D недостатъчност. Вероятно изследването е провеждано през летния сезон, пиков за нивата на витамин D в организма.

В последните години като нов маркер за биодостъпността на калцидиол се въвежда **бионаличният калцидиол**, представящ двете фракции на калцидиола – биологично активната, свободна фракция, и слабо свързаната с плазмения албумин. Проучванията, касаещи промените в бионаличния калцидиол, като допълнителен индикатор за витамин D статуса, са изключително малко и основно са насочени към костното

здраве. В проучената литература не открихме изследвания, касаещи промени в бионаличния калцидиол при пациенти със заболявания на простатата. Данните от настоящото проучване, касаещи нивата на бионаличния калцидиол са първи по рода си за пациенти с простатен карцином и с доброкачествени заболявания на простатата. Установените значимо по-ниски нива на бионаличния калцидиол при болните с простатен карцином спрямо тези с доброкачествени заболявания на простатата не са изненадващи, те следват хода на промените в общия серумен калцидиол и потвърждават предположението за намалена биодостъпност на субстрат за простатната 1-алфа хидроксилаза.

Би могло да се предполага, че ниските циркулиращи нива на калцидиол при раково болните пациенти не могат да осигурят достатъчно субстрат за простатната 1-алфа-хидроксилаза, с което да се подсури локалната и адекватна в количествено отношение биосинтеза на активната форма на витамин D. В подкрепа на тази идея е и наблюдението, че неопластични простатни клетки се характеризират с намалена активност на 1-алфа-хидроксилазата в сравнение с нормални епителни клетки от простатна жлеза (Chen et al, 2003). Комбинацията от тези два фактора води до драматично понижена възможност за синтеза на активната форма на витамин D в простатните карциномни клетки, което предопределя и невъзможността за проява на протективните функции на витамин D, като диференциращ и антипролиферативен агент.

Като основен транспортен протеин за витамин D, неговата циркулираща и активна форма, VDBP играе важна роля в поддържането на витамин D статуса на организма и в регулацията на свободната фракция на витамин D, отговорна за биологичното му действие в различни тъкани и клетки (Chun et al, 2012). Сравнително високите му плазмени концентрации (μM) в сравнение с тези на калцидиол (nM) обясняват неговата резервоарна функция по отношение на циркулиращата форма на витамин D, осигурявайки таргетните тъкани с допълнителни количества калцидиол за предотвратяване на кратковременен витамин D дефицит. Изследвания от последните години върху клетъчни култури от ракови клетки представят данни за антитуморното действие на VDBP (Pacini et al, 2012). В настоящото проучване не е установено понижение във VDBP при РСa болните в сравнение с ДЗП групата. Някои автори намират слаба, но незначима връзка между плазмени нива на калцидиол и VDBP при 29133

финландци на възраст 50 – 69 години, суспектни за простатен карцином. Установено е, че високи нива на VDBP и ниски нива на калцидиол са свързани с по-малък риск от простатен карцином. (Weinstein et al, 2013). В други проучвания се установява обратна зависимост между VDBP и риска от простатен карцином при мъже от негроидната раса (Layne et al, 2017).

Витамин D и PSA

Предвид антипролиферативния ефект на калцитриол, логично е да се очаква, че при РСa пациенти с дефицит на витамин D, стойностите на PSA, като маркер за деструкция на простатата ще са повишени. Това предположение се потвърждава от резултатите в настоящото проучване, установяващи тенденция на влошен витамин D статус при РСa болните с PSA над 20 ng/ml, както и по-висок PSA за болните витамин D дефицит (<50 nmol/L). Не се установява причинно-следствена връзка между нивата на PSA и калцидиол при РСa болните. Подобни са резултатите на Vander Velde et al (2015), които също не намират корелация между нивата на калцидиол и тези на PSA ($r = -0.002$; $p > 0.05$) при 119 пациенти с простатен карцином на средна възраст 66.27 години (Vander Velde et al, 2015). За влошен витамин D статус, свързан с по-високи стойности на PSA при болни с простатен карцином съобщават и Grant et al (2014).

Витамин D статус и риск от биохимичен рецидив

Взаимовръзката витамин D статус и риск от рецидив на простатния карцином е обект на множество изследвания в литературата. Някои проучвания посочват позитивна взаимовръзка между ниски нива на калцидиол и риска (Sawada et al, 2017), други автори установяват, че високите нива на калцидиол са свързани с умерено висок риск от простатен карцином (Schenk et al, 2014, Albanes et al, 2011).

В настоящото проучване е установена статистически значима обратна корелация както за общия серумен калцидиол, така и за бионаличния калцидиол с риска от рецидив на простатния карцином. В подкрепа на нашите резултати са тези на Ahonen (2000), които в проспективно, 13 годишно лонгитудинално проучване върху 19000 финландски мъже установяват, че ниските серумни нива на калцидиол са свързани с по-висок риск от простатен карцином (Ahonen et al, 2000). Скорошно

проучване на Gao et al (2018), обобщаващо резултатите от 19 проспективни изследвания установява, че високият серумен калцидиол корелира позитивно с по-висок риск от рак на простатата (Gao et al, 2018). Изследване на Holt et al (2013), проследили нивата на калцидиол при 1476 болни с простатен карцином за период от 11 години не са установили значими разлики нивата на калцидиол (Holt et al, 2013).

Разнопосочността на резултатите, посочващи корелационна връзка както между ниски, така и между високи нива на калцидиол с риска от простатен карцином лансира хипотезата за U-видна зависимост на риска от серумния калцидиол (Tuohimaa et al, 2004). Едно възможно обяснение на този така наречен U-виден риск е приблизително еднакво ниското количество на калцитриол в простатните клетки както при ниските, така и при много високите серумни нива на калцидиол. Предполага се, че ниските нива на калцидиол са свързани с дефицита на субстрат за 1-алфа хидроксилазата, а високите водят до тъканна резистентност чрез авторегулационни процеси на повишена експресия на 24-хидроксилазата, водеща до получаване на неактивните метаболити 1,24-дихидрокс витамин D и 24,25-дихидрокс витамин D.

Витамин D статус и агресивност на туморния процес

В моделни системи е установено, че карциномни простатни епителни клетки експресират VDR, което предполага, че активната форма на витамин D участва в регулацията на техния растеж и пролиферация. Това се подкрепя от някои клинични проучвания, според които витамин D намалява прогресията и агресивността на туморния процес (Lou et al, 2004).

Нашите резултати показват, макар и статистически незначими, по-ниски стойности на калцидиола при пациентите с по-агресивен туморен процес (скор на Gleason ≥ 7) спрямо тези с по-слабо агресивен карцином на простатата (41.74 ± 17.83 nmol/L спрямо 46.23 ± 21.91 nmol/L). Установена е слаба, но значима негативна корелация между нивата на калцидиол и скор на Gleason, отразяващ степента на агресивност. Нашите резултати са в съответствие с данните на Gilbert et al (2012), които при 1447 мъже с рак на простатата (153 с авансирал карцином и 469 с по-агресивна форма) установяват, че витамин D дефицитните пациенти са с 2 пъти по-висок риск от развиване на по-агресивен

простатен карцином. Същите автори установяват при 974 пациента със скор на Gleason < 7 и при 469 със скор на Gleason ≥ 7 значимо по-ниски нива на калцидиол при болните с по-агресивен туморен процес (Gilbert et al, 2012).

Може да се предположи, че противоречията в резултатите от епидемиологичните изследвания се дължат на това, че засега се проследяват само плазмените нива на метаболитите на витамин D, които понякога се различават значимо от локалните им нива в засегнатата тъкан. Трябва да се отчита и факта, че при някои напреднали ракови заболявания витамин D метаболизмът и VDR експресията в съответната засегната тъкан са така дерегулирани и променени, че витамин D, дори и наличен в достатъчни количества в циркулацията, не е в състояние да прояви антитуморните си ефекти.

Андрогенен статус

В литературата данните за промените в нивата на андрогените при болни с простатен карцином са твърде противоречиви. Някои автори установяват значимо по-ниски нива на тестостерон при пациенти с простатен карцином в сравнение с тези при болни с доброкачествени заболявания на простатата (Mearini et al, 2008), а други докладват за повишени стойности на този показател при раковоболните пациенти (Usoro et al, 2015).

Резултатите от настоящото изследване показват, че средните стойности на отделните изследвани андрогени както и нивата на SHBG за болните с простатен карцином, попадат в установените референтни интервали, посочени в използвания търговски кит за анализ. Въпреки това, средните нива на общия тестостерон, считан като основен андроген за определяне на андрогенния статус са под „cut off“ стойността 12.1 nmol/L. Спрямо групата болни с доброкачествени простатни заболявания, средните нива на общия тестостерон са значимо по-ниски при пациентите с простатен карцином, а тези на DHEAs са значимо по-високи. Нашите данни са в съответствие с резултатите на Stattin et al (2004) и Gurbuz et al (2012), които установяват значимо по-ниски нива на общия тестостерон при пациенти с рак на простатата спрямо контролна група здрави индивиди (Stattin et al, 2004, Gurbuz et al, 2012).

Счита се, че свободният тестостерон е по-добър индикатор за локалния андрогенен статус в простатната жлеза, отколкото общия серумен тестостерон (Regis et al, 2017). При нашите РСa пациенти серумните нива на свободния тестостерон са значимо по-ниски спрямо тези на ДЗП групата ($p < 0.01$). Подобни резултати съобщават Travis et al (2007) при РСa пациенти спрямо контролна група (Travis et al, 2007).

Концентрацията на общия и свободния тестостерон се регулира от редица фактори. Такива са DHEAs и андростендион като прекурсори за биосинтеза на тестостерон. В допълнение, концентрацията на свободния тестостерон силно зависи от концентрацията на транспортния белтък SHBG (Chang et al, 2012). Сред андрогените тестостеронът има по-нисък афинитет за свързване с SHBG, отколкото неговата активна форма дихидротестостерон. Счита се, че SHBG модулира съотношението между свободния тестостерон и свързания с SHBG и плазмения албумин, регулира тяхната бионаличност и действа не само като фактор, регулиращ андрогенния баланс, но и като амплификатор на техните ефекти. Предполага се, че увеличени нива на SHBG могат да бъдат свързани с намалена биоактивност на андрогени. Пред вид тези регулаторни ефекти на SHBG върху андрогенния баланс, може да се предположи, че този транспортен протеин има отношение към развитието на хормон-зависими тумори, включително и при простатен карцином (Thaler et al, 2015).

В настоящото проучване не се откриват значими промени в SHBG при карциномните пациенти в сравнение с болните с доброкачествени заболявания на простатата. Възможна причина е голямата статистическа вариация и сравнително малкия брой на извадката на болните с доброкачествени заболявания (39 души). В съответствие с нашите резултати Sawada et al (2010) също не намират различие в нивата на SHBG при РСa пациенти и контролна група (Sawada et al, 2010).

Други автори установяват значимо по-ниски стойности на SHBG при раково болните в сравнение със стойностите на същия показател при здрави индивиди (51.8 nmol/L спрямо 54.4 nmol/L; $p = 0.01$), (Stattin et al, 2004). В някои проучвания е установена тенденция за повишение на този показател при раково болни пациенти спрямо ДЗП болни (Garcia-Cruz et al, 2012, De Nunzio et al, 2013).

Може да се спекулира, че андрогенният дисбаланс, установен при нашите пациенти с простатен карцином (значимо повишен DHEAs, намалени общ и свободен тестостерон, непроменен андростендион) е резултат от променена активност на някои ензими, участващи в андрогенния метаболизъм в простатната жлеза. В литературата са описани алтернативни метаболитни пътища за генериране на дихидротестостерон – активната форма на тестостерон в ракови простатни клетки, които вероятно са по-активни, отколкото класическия път за биосинтез на андрогени (Mostaghel et al, 2013).

Андрогенен статус и клинични и биохимични параметри, оценяващи хода на простатния карцином

Взаимовръзките между различните андрогени и клинични параметри, оценяващи тежестта и агресивността на простатния карцином са обект на интензивни изследвания в литературата. Резултатите обаче, остават твърде противоречиви.

В настоящото проучване не се откриват значими разлики в нивата на изследваните андрогени между групите с нисък и висок риск от костни метастази. Изключение правят андростендион и производният показател PSA/общ тестостерон които са значимо повишени при високорисковата група. Установената тенденция на понижаване на общия и свободен тестостерон при високорисковата група се потвърждава от проучването на Garcia-Cruz et al (2012) при изследване на общ и свободен тестостерон и SHBG в зависимост от PSA при 137 пациента с простатен карцином. Те установяват статистически значимо понижение в свободния тестостерон между групите с висок, умерен и нисък риск от костни метастази (Garcia-Cruz et al, 2012). В съответствие с резултатите на тези автори е установената от нас негативна корелативна зависимост на PSA с общ и свободен тестостерон и с техния прекурсор DHEAs.

Свободният андрогенен индекс (общ тестостерон/SHBG) се препоръчва при оценка на абнормален андрогенен статус като индиректен индикатор за нивата на свободния тестостерон. Нашите резултати установяват негативна статистически значима корелация на този показател както с риска от биохимичен рецидив, така и с агресивността на туморния процес, оценявана по скората на Gleason. В подкрепа на нашите резултати са данните на Hoffman et al (2000), които при ретроспективно проучване

за период от 3 години върху 117 мъже с простатен карцином установяват обратна зависимост между нивата на свободния тестостерон и агресивността на тумора (Hoffman et al, 2000). Проучване на Garcia-Cruz et al (2012) установява значимо намаление в нивата на тестостерона с нарастване на риска от биохимичен рецидив. Проспективно проучване на Lane et al (2008) върху 455 болни с локализиран простатен карцином, лекувани с радикална простатектомия не установява асоциация между тестостерон и риска от биохимичен рецидив (Lane et al, 2008).

От изследваните андрогени общият тестостерон показва ясна тенденция на понижение при пациентите с по-агресивни тумори. Неговите нива са в обратна зависимост със скората на Gleason. Shiota et al (2015) също установяват подобна зависимост между скората на Gleason и общия тестостерон при 128 пациенти с простатен карцином. В подкрепа на нашите данни са и резултатите на Schatzl et al (2001), които при 156 пациенти с новодиагностициран простатен карцином установяват по-висок скор на Gleason при болните с по-ниски нива на общ тестостерон. Ретроспективно проучване на Drobková et al (2017) върху 201 пациента с простатен карцином след проведена радикална простатектомия не установява значими разлики в общия тестостерон между групите, стратифицирани според скората на Gleason, както и корелативна зависимост между тези два показателя. Авторите считат, че общият тестостерон не е статистически значим предиктор за агресивността на туморния процес (Drobková et al, 2017).

Трофичният ефект на тестостерона е широко документиран в литературата. Има данни, говорещи в полза на предположението, че самата простатна жлеза влияе върху серумните нива на андрогените. Предполага се *in situ* инхибираща роля на простатата върху андрогенезата в резултат на злокачествените промени при простатен карцином (Hoffman et al, 2000). Тази взаимовръзка между нисък серумен тестостерон и повишена агресивност на простатния карцином в последните години се обяснява с насищане на андрогенния рецептор с тестостерон и дихидротестостерон (Morgentaler, 2006, Morgentaler et al, 2012). Според сатурационната хипотеза, андрогенният рецептор се насища при концентрации на тестостерон около 8 nmol/L и всяко повишение в тестостероновите нива над тази граница не води до значими промени в простат-специфичния антиген, приет като маркер за

пролиферация и деструктивни промени в простатната жлеза (Morgentaler et al, 2012, Morgentaler et al, 2015). Предполага се, че повишената концентрация на андрогени има стимулиращ ефект върху клетъчната пролиферация само при концентрации по-ниски от физиологичните (Song et al, 2014). Някои автори дори считат, че ниските нива на тестостерона са независим рисков фактор за по-агресивен простатен карцином (Albuquerque et al, 2017, Bayar et al, 2017).

III. Изследване на прогностичната стойност и диагностичната ефективност на витамин D и андрогени при злокачествени заболявания на простатата

Оценяване влиянието на изследваните андрогени върху витамин D статуса чрез многофакторен регресионен анализ.

Въпреки, че заболяванията на простатата (бенигнени и малигнени) са едни от най-широко разпространените сред мъжката популация, етиологията на тези заболявания все още не е напълно изяснена. Много фактори определят възникването и хода на тези заболявания като до момента добре установените рискови фактори за тях са възраст, фамилна обремененост и расова принадлежност (Travis et al, 2007). През последните години се преразглежда изцяло андрогенната хипотеза за възникването на тези заболявания като на преден план излиза изследването на модифициращи фактори, спомагащи за промяна на хода на тези заболявания, например като витамин D. Това ни мотивира да изследваме взаимовръзките между различните видове стероиди – андрогени и витамин D с добре установените клинични показатели, оценяващи стадия, прогнозата и хода на простатните заболявания.

Изследвани са взаимовръзките между серумен калцидиол (зависима променлива) и SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс като предиктори. С цел да се установи влиянието на посочените по-горе предиктори върху зависимата променлива е проведен многофакторен линеен регресионен анализ. Резултатите са представени на таблици 21 и 22.

Таблица 21. ANOVA анализ на серумен калцидиол (зависима променлива) и SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс (предиктори).

ANOVA^a

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	3497.382	3	1165.794	3.646	.017 ^b
Residual	21105.253	66	319.777		
Total	24602.635	69			

a. Dependent Variable: серумен калцидиол (25OHD)

b. Predictors: (Constant), SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс

От таблица 21 е видно наличието на статистическа значимост за комбинацията от променливите SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс и прогнозата на серумния калцидиол (ANOVA; $F(3,66) = 3.65$, $p < 0.05$).

На таблица 22 са представени коефициентите на регресионното уравнение за всеки от изследваните предиктори и съответната статистическа значимост.

Таблица 22. Резултати от регресионния анализ на асоциацията между серумен калцидиол (зависима променлива) и SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс (предиктори).

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95.0% Confidence Interval for B	
	B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
(Constant)	46.593	8.103		5.750	.000	30.414	62.772
свободен андрогенен индекс	22.306	21.023	-.147	1.061	.293	-64.279	19.668
% свободен тестостерон	30.156	10.139	.342	2.974	.004	9.913	50.399
SHBG	-.116	.066	-.245	1.768	.082	-.247	.015

a. Dependent Variable: серумен калцидиол (25OHD)

Според данните от таблица 22 се получава следното регресионно уравнение:

$$\text{серумен калцидиол} = 46,59 + 30,16 (\text{процент свободен тестостерон}) - 0,12 (\text{SHBG})$$

В настоящия регресионен модел се установяват 2 статистически значими променливи – процент свободен тестостерон и SHBG. С позитивно влияние е процентът свободен тестостерон ($\beta = 0,34$; $p < 0,01$), а SHBG е с отрицателно влияние ($\beta = -0,25$ $p = 0,08$).

На таблица 23 са представени в обобщен вид данните за силата на зависимостта между комбинацията на независимите променливи и зависимата променлива за оценка на взаимодействието между тях.

Таблица 23. Обобщена таблица за модела, описващ асоциацията между серумен калцидиол (зависима променлива) и SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс (предиктори).

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.377 ^a	.142	.103	17.882298

a. Predictors: (Constant), SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс

b. Dependent Variable: серумен калцидиол (25OHD)

Резултатите показват, че относително малък дял (~10%) от измененията в зависимата променлива (серумен калцидиол) могат да се обяснят от представения регресионен модел.

Оценяване влиянието на витамин D статуса, андрогени и утвърдени рискови фактори за простатен карцином върху агресивността на тумора чрез многофакторен регресионен анализ.

Резултатите от изследването на асоциациите между андрогени, калцидиол, PSA, утвърдени рискови фактори (възраст, BMI и сезон) с

широко използваната патоморфологична оценка по Gleason са представени на таблица 24.

Таблица 24. Обобщена таблица за модела, описващ асоциацията между скор на Gleason (зависима променлива) и андрогени, калцидиол, PSA, утвърдени рискови фактори (възраст, BMI и сезон) (предиктори).

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics					Durbin-Watson
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change	
1	0,61 ^a	0,377	0,233	,874	,377	2,621	12	52	0,008	2,240

a. Predictors: (Constant), свободен тестостерон, PSA, калцидиол, възраст, сезон, андростендион, PSA/TT, BMI, свободен андрогенен индекс, DHEAs, общ тестостерон

b. Dependent Variable: скор на Gleason

От таблицата е видно, че моделът с включени предиктори – свободен тестостерон, PSA, калцидиол, възраст, сезон, андростендион, PSA/TT, BMI, свободен андрогенен индекс, DHEAs, общ тестостерон и зависима променлива – скор на Gleason е приложим и статистически значим (ANOVA; $F=2,621$; $p=0,008$). Той показва, че приблизително 23% от измененията в зависимата променлива (скор на Gleason) могат да се обяснят от представения регресионен модел.

На таблица 25 са представени данните от регресионния анализ, описващ асоциациите между скор на Gleason (зависима променлива) и андрогени, калцидиол, PSA, утвърдени рискови фактори (предиктори). От таблицата е видно, че в настоящия регресионен модел се установяват две статистически значими променливи - PSA и калцидиол. С позитивно влияние е PSA ($\beta= 0,49$; $p<0,0001$), а калцидиол е с отрицателно влияние ($\beta= - 0,24$ $p=0,04$).

Таблица 25. Резултати от регресионния анализ на асоциацията между скората на Gleason (зависима променлива) и андрогени, калцидиол, PSA, утвърдени рискови фактори (предиктори).

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95,0% Confidence Interval for B	
	B	Std. Error	Beta (HR)			Lower Bound	Upper Bound
(Constant)	3,771	2,320		1,626	0,110	-,884	8,425
сезон	0,321	0,255	0,16	1,262	0,213	-,190	,832
възраст	0,031	0,023	0,17	1,335	0,188	-,016	,078
BMI	0,007	0,032	0,03	0,219	0,827	-,057	,071
PSA	0,013	0,003	0,49	4,01	0,000	,007	0,020
калцидиол	-0,012	0,006	-0,24	-2,11	0,040	-,024	-0,001
андростендион	0,098	0,048	0,263	2,06	0,044	0,003	0,194
DHEAs	0,146	0,148	0,170	0,98	0,328	-0,151	0,442
общ тестостерон	-0,007	0,052	-0,03	-0,12	0,899	-0,111	0,097
свободен тестостерон	-0,004	0,024	-0,05	-0,18	0,854	-0,053	0,044
свободен андрогенен индекс	0,159	1,087	0,020	0,147	0,884	-2,021	2,340
PSA/общ тестостерон	-5,811E-008	0,000	-0,03	-0,28	0,783	0,000	0,000

BMI – индекс телесна маса; PSA – простатно-специфичен антиген; DHEAs – дехидроепиандростерон сулфат

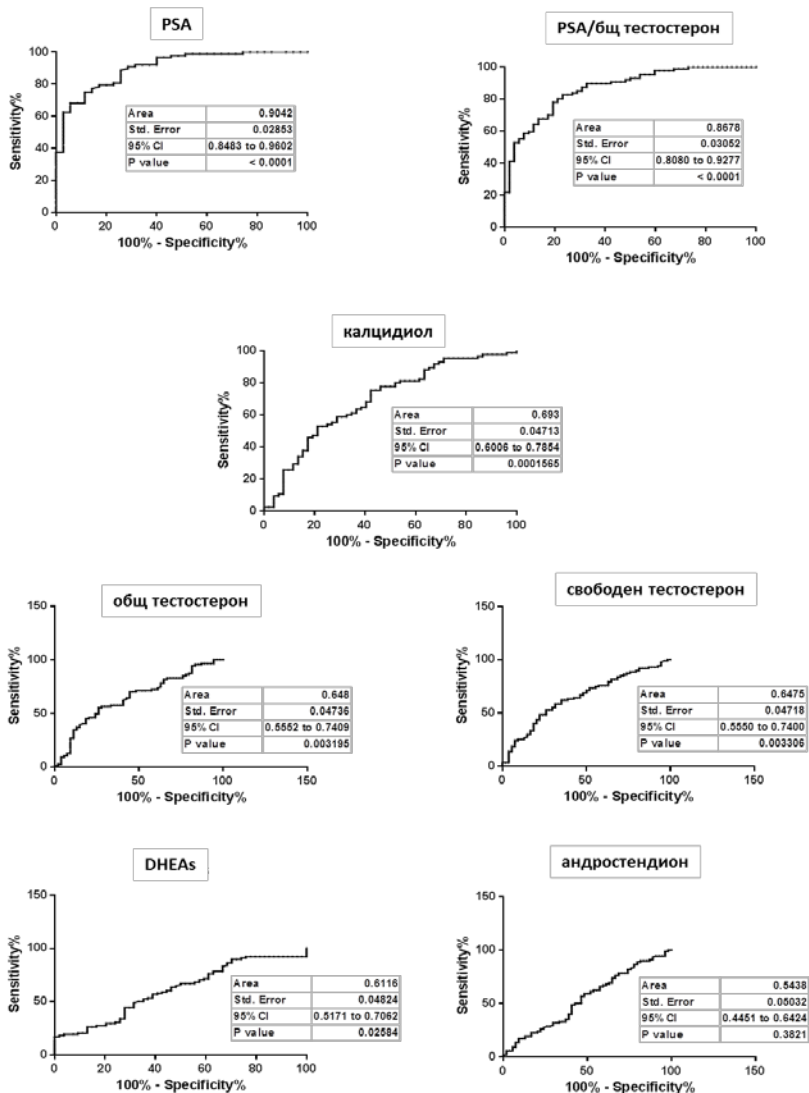
Изследването на взаимовръзките между калцидиол и показателите, характеризиращи метастатичния потенциал на тумора (засягане на семенни мехурчета, лимфни възли и разпространение на туморния процес извън простатната жлеза) при болни с простатен карцином показва обратна зависимост с гранична статистическа значимост единствено между калцидиол и разпространение на туморния процес извън простатната жлеза ($R = -0.16$, $p = 0.07$).

Провеждането на еднофакторен регресионен анализ за изследване на асоциацията между калцидиол и риска от биохимичен рецидив показва обратна зависимост с гранична статистическа значимост ($R = -0.15$, $p = 0.08$).

Оценка на диагностичната ефективност на изследваните стероиди (калцидиол и андрогени) чрез ROC анализ

За оценка на диагностичната ефективност на изследваните лабораторни показатели, отдиференциращи вярно пациентите с доброкачествени заболявания на простатата от болните с простатен карцином е проведен ROC-анализ (receiver operating characteristic – операционни характеристични криви на наблюдателя или крива на грешките). Построени са и съответните ROC криви. Количествен показател при интерпретация на резултатите от ROC-анализа е параметърът AUC (area under ROC curve – площ под ROC-кривата). Изследвана е диагностичната ефективност на следните показатели: PSA, калцидиол, общ и свободен тестостерон, свободния андрогенен индекс, процент свободен тестостерон, SHBG, DHEAs, андростендион и съотношенията PSA/TT. От изследваните показатели $AUC > 0.5$ е установена за PSA, калцидиол, общ и свободен тестостерон и съотношенията PSA/TT, представени на фигура 26.

Като изключим високата дигностична ефективност на PSA и неговото производно PSA/TT, който е утвърден лабораторен показател за пролиферативни процеси и деструкция на простатната жлеза, най-висока AUC е демонстрирана за калцидиол – 0,69, $p < 0,001$, а най-ниска за андростендион – $AUC = 0,54$, $p > 0,05$ (фиг. 26).



Фиг. 26. Диагностична ефективност на изследваните лабораторни показатели, дискриминиращи вярно пациентите с доброкачествени заболявания на простатата от болните с простатен карцином. DHEAs – дехидроепиандростерон сулфат; статистическа значимост е отчитана при $p < 0,05$.

Обсъждане на резултатите

Все още етиологията на простатните заболявания (доброкачествени и злокачествени) не е ненапълно изяснена. Като потенциални рискови фактори, водещи до тези заболявания, се посочват възраст, етническа принадлежност, географска ширина на местоживеене, генетични фактори, както и различни хранителни режими, начин на живот и физическа активност, фактори от околната среда. Многофакторната природа на заболяванията на простатата изисква да се оценява тяхното въздействие комплексно, а не поотделно. Освен утвърдените генетични, възрастови и фактори на околната среда в последните години вниманието е насочено към изясняване ролята на различните стероиди по отношение на възникване, прогресия и прогноза на тези заболявания.

Макар и малко на брой, съществуват и епидемиологични проучвания, изследвали взаимовръзката калцитриол – андрогени, но резултатите са твърде противоречиви. Рандомизирано контролирано проучване върху 54 здрави витамин D дефицитни мъже установява, че суплементиране с 83µg витамин D в продължение на 1 година води до значимо повишение в нивата на общия, свободния и биоактивния тестостерон на фона на отсъствие на промени при плацебо групата (Pilz et al, 2011). Позитивна взаимовръзка между серумен калцидиол и общ тестостерон е доказана при здрави мъже от Европидната раса (Wehr et al, 2010, Lee et al, 2012). Позитивна зависимост, между серумен калцидиол, общ и свободен тестостерон, линейна в ниския концентрационен диапазон на калцидиол (до 75-85 nmol/L) и достигаща плато при високите серумни концентрации е установена от Nimptsch (2012). Пространно проучване на NHANES върху повече от 1500 мъже, изследващо взаимовръзки между калцидиол и андрогени за риска от възникване на простатен карцином, както и взаимовръзки между калцидиол и PSA и андрогени и PSA установява положителна асоциация с общ тестостерон и SHBG (Anic et al, 2016). Други автори не намират значими взаимовръзки между калцидиол и общ тестостерон (Chin et al, 2015).

В настоящото проучване е оценено взаимодействието не само между калцидиол и отделните андрогенни стероиди, но и техни производни като свободен андрогенен индекс (общ тестостерон/SHBG), съотношенията PSA/тестостерон, процент свободен тестостерон. Установи се значима

позитивна асоциация между калцидиол и процента свободен тестостерон и отрицателна и статистически незначима ($p=0,08$) взаимовръзка с SHBG при пациенти с рак на простатата. Такива асоциации с калцидиол не са намерени за отделните андрогени. Може да се предположи, че производните андрогенни показатели са по-чувствителни, отколкото самостоятелно използваните андрогени. Възможно обяснение за тази позитивна връзка между серумен калцидиол и процента свободен тестостерон е стимулиращата роля на калцитриол върху ензимите от биосинтеза на тестостерон, доказана в модели на клетъчни култури и експериментални животни (Hofer et al, 2014, Bouillon et al, 2008). От друга страна, изследването на взаимовръзките между скората на Gleason, патоморфологичен параметър, оценяващ агресивността на туморния процес и разнообразие от фактори като възраст, BMI, сезонност, нива на PSA, андрогени и техни производни и калцидиол установява статистическо значимо влияние единствено за PSA и калцидиол. Повишаването на PSA както и задълбочаване на витамин D дефицита са свързани с по-агресивния характер на туморния процес.

Прегледът на литературата показва, че настоящото проучване е единствено до момента, изследвало чрез ROC-анализ диагностичната ефективност не само на рутинни лабораторни параметри, използвани в диагностиката и наблюдението на болни с простатен карцином, но и на калцидиол. Площта под ROC-кривата, AUC, категорично показва, че калцидиол е по-показателен от редица андрогени и техни производни, които са изследвани до момента (Ferro et al, 2016).

Не случайно в последно време витамин D е един от стероидите, който интензивно се изследва. Провеждат се редица интервенционални проучвания, насочени към подобряване на витамин D статуса за предотвратяване на такива тежки заболявания като простатния карцином.

Обобщение на основните резултати

I. Витамин D статус и заболявания на простатната жлеза

1. Установен е по-неблагоприятен витамин D статус при болните с простатен карцином, доказан чрез значимо по-ниските нива на калцидиол и бионаличен калцидиол в сравнение със стойностите на тези показатели при болните с доброкачествени заболявания на простатата ($p < 0,001$ за калцидиол; $p < 0,05$ за бионаличен калцидиол).
2. През „топлия“ сезон на вземане на кръвта се установяват значимо по-високи серумни концентрации на калцидиол при двете групи пациенти. За карциномните пациенти те почти достигат граничната стойност от 50nmol/L, а за болните с доброкачествени заболявания – са в оптималния диапазон за витамин D.
3. При пациентите с карцином на простатата се установява тенденция на понижение на калцидиол и бионаличен калцидиол с нарастване на риска от костни метастази, оценен чрез PSA над 20ng/ml.
4. Серумните нива на калцидиол и бионаличен калцидиол са значимо понижени при карциномните пациенти с по-висок риск от биохимичен рецидив. Между нивата на циркулиращия витамин D, бионаличния калцидиол и риска от биохимичен рецидив се доказва негативна корелативна връзка (Spearman $r = -0,21$, $p = 0,05$ за калцидиол; Spearman $r = -0,34$, $p = 0,01$ за бионаличен калцидиол).
5. Серумният калцидиол е понижен при пациентите с по-агресивен простатен карцином и е в обратна корелативна зависимост с оценката по Gleason (Spearman $r = -0,26$, $p < 0,05$).

II. Андрогенен статус и заболявания на простатна жлеза

1. Серумните нива на общ, свободен тестостерон и техния прекурсор DHEAs са значимо по-ниски при карциномните пациенти в сравнение с техните стойности при пациентите с доброкачествено засягане на жлезата ($p < 0,01$ за общ тестостерон; $p < 0,01$ за свободен тестостерон; $p < 0,05$ за DHEAs). Тези показатели са в обратна корелативна зависимост с PSA при карциномните болни (Spearman $r = -0,23$, $p < 0,05$ за общ тестостерон; Spearman $r = -0,28$, $p < 0,01$ за свободния тестостерон; Spearman $r = -0,22$, $p < 0,05$ за DHEAs).

2. При карциномните пациенти серумните нива на общия тестостерон се намаляват с увеличаване на риска от биохимичен рецидив ($p = 0,07$) и с агресивността на тумора ($p = 0,08$).
3. Установява се негативна корелативна връзка между общия тестостерон и туморната агресивност (Spearman $r = -0.20$, $p = 0.06$).
4. Свободният андрогенен индекс е в обратна корелативна зависимост с риска от биохимичен рецидив (Spearman $r = -0.23$, $p < 0.05$) и с агресивността на простатния карцином (Spearman $r = -0.26$, $p < 0.05$).
6. При двете групи пациенти, с доброкачествени и злокачествени заболявания на простатата, се установява положителна корелативна връзка между серумен калцидиол и процента свободен тестостерон (Spearman $r = 0.29$, $p < 0.05$ за пациентите с доброкачествени заболявания; Pearson $r = 0.25$; $p < 0.05$ за карциномните пациенти). Тези резултати подкрепят предположението, че витамин D статуса повлиява нивата на тестостерона.

III. Взаимозависимости между витамин D статус, андрогенен статус и клинични детерминанти при пациенти със заболявания на простатата

1. Регресионният модел, изследващ влиянието на андрогените (SHBG, процент свободен тестостерон и свободен андрогенен индекс) върху серумния калцидиол установява позитивно влияние на процента свободен тестостерон ($\beta = 0.34$, $p < 0.01$) и отрицателно влияние на SHBG ($\beta = -0.25$, $p = 0.08$).
2. Регресионният модел, изследващ влиянието на андрогени, калцидиол, PSA и утвърдени рискови фактори (възраст, BMI и сезон) върху агресивността на тумора установява положително влияние на PSA ($\beta = 0.49$, $p < 0.0001$) и отрицателно влияние на калцидиол ($\beta = -0.24$, $p < 0.05$).
3. ROC-анализът, изследващ диагностичната ефективност на андрогени и витамин D за отдиференциране на пациентите с доброкачествено заболяване от тези с простатен карцином, установява по-висока диагностична ефективност на калцидиол (AUC = 0.69, $p < 0.001$) в сравнение с по-широко използвания тестостерон (AUC = 0.65, $p < 0.01$).

Изводи

I. Витамин D статус и заболявания на простатната жлеза

1. Установен е витамин D дефицит при болните с простатен карцином и витамин D недостатъчност при пациентите с доброкачествено заболяване.
2. При пациентите с карцином на простатата се установява влошаване на витамин D статуса (значимо по-ниски калцидиол и бионаличен калцидиол):
 - при стойности на PSA над 20ng/ml, свързани с увеличен риск за костни метастази;
 - с увеличаване на риска от биохимичен рецидив;
 - с повишаване на агресивността на тумора.
3. Установената сезонна зависимост в серумните нива на калцидиол и бионаличен калцидиол при пациентите с доброкачествени и злокачествени заболявания на простатата показва, че сезонът на вземане на кръвната проба е важен фактор при анализа на витамин D статуса.

II. Андрогенен статус и заболявания на простатната жлеза

1. При пациентите с простатен карцином се установяват значимо по-ниски нива на андрогените (общ и свободен тестостерон и DHEAs) спрямо болните с доброкачествено засягане на жлезата, без да се достига до хипогонадизъм.
2. При пациентите с карцином на простатата се установяват значими негативни корелации между:
 - общ и свободен тестостерон и DHEAs и PSA
 - свободния андрогенен индекс и риска от биохимичен рецидив
 - свободен андрогенен индекс, общ тестостерон и агресивността на тумора
3. Отсъствието на сезонност в изследваните андрогени при пациентите с доброкачествени и злокачествени заболявания на

простатата показва, че сезонът на вземане на кръвната проба не оказва влияние върху резултатите.

III. Прогностична стойност и диагностична ефективност на витамин D и андрогени при злокачествени заболявания на простатата

1. Установена е положителна взаимовръзка между процента свободен тестостерон и серумен калцидиол.
2. Установено е, че от изследваните биохимични показатели върху агресивността на простатния карцином в най-голяма степен влияят повишените стойности на PSA и намалените нива на калцидиол.
3. От изследваните стероиди калцидиол показва най-висока диагностична ефективност за отдиференциране на пациентите с доброкачествено заболяване на простатата от тези с простатен карцином.

Приноси

I. Приноси с оригинален научен и научно-приложен характер

1. За първи път е направен **сравнителен анализ на витамин D статуса** на представителна извадка болни от българската популация с хронично засягане на простатната жлеза – доброкачествени заболявания на простатата и простатен карцином.
2. За първи път в оценката на витамин D статуса са изследвани **два нови биомаркера**, бионаличен калцидиол и витамин D свързващ глобулин, първият от които е с по-голямо значение, съпоставимо с това на калцидиола.
3. За първи път е направен **сравнителен анализ на андрогенния статус** на представителна извадка болни от българската популация с хронично засягане на простатната жлеза – доброкачествено и злокачествено.
4. За първи път андрогенният статус е оценяван освен чрез рутинно използваните общ и свободен тестостерон, но и с въведен **разширен панел** от андрогени, андрогенни индекси и основен транспортен белтък за андрогени.
5. Настоящото проучване е единствено до момента, оценило чрез ROC-анализ **диагностичната ефективност не само на рутинни лабораторни параметри**, използвани в диагностиката и наблюдението на болни с простатен карцином, но и на **калцидиол, андрогени и техни индекси** за отдиференциране на доброкачествено от злокачествено заболяване на простатата.

II. Приноси с потвърдителен характер

1. Получени са допълнителни данни, доказващи витамин D недостатъчност при пациентите с доброкачествено засягане на простатната жлеза и витамин D дефицит при пациентите с карцином.

2. Получени са допълнителни данни, доказващи, че влошеният витамин D статус при пациентите с простатен карцином се задълбочава с нарастване на риска от биохимичен рецидив и агресивността на туморния процес.
3. Получени са допълнителни данни, показващи намаление в нивата на тестостерона при пациентите с простатен карцином с нарастване на PSA, риска от биохимичен рецидив и агресивността на туморния процес.
4. Потвърждава се, че агресивността на туморния процес е в зависимост не само от широко използваните рискови фактори като възраст, BMI, PSA и раса, а и от нивата на циркулиращия калцидиол.
5. Потвърдена е сезонната зависимост на серумните нива на калцидиол, което трябва задължително да се взема под внимание при анализ на резултатите.

Списък на публикациите и участията във връзка с дисертационния труд

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Galunska B, Roussev B, Gerova D, Hinev A, Usheva N and Svinarov D. Vitamin D And Androgens In Prostate Disease Patients. World Journal of Pharmaceutical and Medical Research, 4; 2018 (5):57-64.
2. Русев Б, Галунска Б. Какво не знаем за ролята на витамин D и андрогените в простатната канцерогенеза? Съвременна Медицина, 61;2017(1):48-58.
3. Roussev B, Kosev P, Hinev A, Galunska B. Correlation Between Serum Testosterone, Biochemical And Clinical Markers In Prostate Cancer Patients. Journal of IMAB, 22;2016(3):1314-1319.
4. Roussev B, Gerova D, Kosev P, Hinev A, Svinarov D, Galunska B. Is Vitamin D Associated With Testosterone In Benign Prostate Hyperplasia? Scripta Scientifica Medica, 48;2016(4):13-21.

Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. Roussev B, Gerova D, Kosev P, Hinev A, Galunska B, Svinarov D. "Suboptimal vitamin D status in chronic prostate diseases", Европейски конгрес по клинична лаборатория 11-15 юни 2017, Атина, Гърция.
2. Hadjiev B, Gerova D, Kosev P, Hinev A, Galunska B, Svinarov D. „Relationships between vitamin D status, androgens and determinants for severity and progression in some prostate diseases“, 69th AACC Annual Scientific Meetings, 31 юли - 03 август 2017, Сан Диего, САЩ.
3. B. Roussev, P. Kosev. A. Hinev. B. Galunska. „Correlation between serum testosterone, biochemical and clinical markers in prostate cancer patients“, 26-th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria 12 - 15 May 2016, Golden Sands, Bulgaria.
4. Roussev B. Gerova D. Kosev P. Hinev A. Ivanova D. Svinarov D. Galunska B. „Vitamin D and prostate cancer: is there a relationship?“, 13th NuGO Week. 5-8 September 2016, Copenhagen, Denmark.
5. Б. Русев, Д. Герова, П. Косев, А. Хинев, Б. Галунска, Д. Свинаров. „Витамин D статус при доброкачествена простатна хиперплазия“, Национална Конференция по Клинична Лаборатория 29 септември – 1 октомври 2016, Златни Пясъци, България.

6. Б. Русев. „Витамин Д – статус при пациенти със заболявания на простатата“, Пета Национална Научна среща по Биохимия на Асоциацията на Биохимичните катедри в България, 28-30 октомври 2016, Априлци, България.

Финансиране

1. Научен проект No 15002 „ВИТАМИН D И АНДРОГЕНИ ПРИ ХРОНИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ПРОСТАТАТА“, финансиран по Фонд „Наука“, Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Благодарности

Благодаря на всички, които допринесоха за реализирането на този дисертационен труд:

- На моя научен ръководител проф. Бистра Галунска, за оказаната подкрепа и научно ръководство.
- На моя научен консултант проф. д-р Александър Хинев, за помощта и съдействието по клиничната част на дисертацията.
- На доц. д-р Даниела Герова от УС по клинична лаборатория и на д-р Петър Косев от Клиниката по урология, УМБАЛ „Св. Марина“, за тяхната неограничена помощ при анализа и обсъждането на резултатите.
- На Декана на фармацевтичния факултет проф. Диана Иванова, за подкрепата и доверието в мен.
- На доц. Йоана Киселова, ръководител катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика“ и на всички колеги от катедрата за подкрепата.
- На всички мои близки, приятели и роднини за тяхната подкрепа и доверие.